

UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS

FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA

E. A. P. DE MEDICINA VETERINARIA

Leishmaniasis canina

TESIS

para optar el título profesional de Médico Veterinario

AUTORA

Gazelle Marina Huaynates Orellana

Lima-Perú

2009

AGRADECIMIENTOS

A diario te doy las gracias Jehová, por la luz preciosa que tú me das. Te doy las gracias por poderte orar, las cargas alivias y me das paz, que tu Hijo nos dieras es de agradecer, al Hades y muerte pudo vencer (1Te 5:18).

Gracias, oh Jehová nuestro padre, desde tiempo indefinido aun hasta tiempo indefinido. Tuya, oh Jehová, es la grandeza, el poderío, la hermosura, la excelencia y la dignidad, porque todo lo que hay en los cielos y en la tierra es tuyo (1Cr 29:10-13).

Gracias por haberme dejado saber que tú todo lo puedes, y que no hay idea que te sea irrealizable (Job 42:3).

Gracias a Abelardo y Lidia, mis amados padres. Por su inmenso amor, sacrificio, abnegación y ejemplo.

Gracias a Karen, Johan, Abelardo y Bryan, mis hermanitos, por su cariño y apoyo incondicional en todos los momentos de mi vida.

A Oswaldo, por ser mi compañero, mejor amigo, mi hermano, mi confidente, gracias amado esposo.

ÍNDICE DE CONTENIDO

CONTENIDO	Pág.
I. INTRODUCCIÓN	1
II. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA	3
1. Generalidades.	3
2. Etiología.	4
2.1. Taxonomía.	4
2.2. Ciclo biológico.	4
2.3. Morfología.	8
2.4. Organización celular.	9
2.5. Variación en la expresión proteica.	10
2.6. Alimentación.	11
2.7. Reproducción.	11
2.8. Genoma.	12
3. Vectores asociados.	14
3.1. Taxonomía.	14
3.2. Ciclo biológico.	14
3.3. Comportamiento.	16
3.4. Morfología.	16
3.5. Hábitat.	19
3.6. Alimentación.	19

3.7.	Nombres comunes.	20
3.8.	Actividad circadiana.	20
3.9.	Feromonas.	20
3.10.	Métodos de captura.	20
3.11.	Métodos de conservación.	22
3.12.	Disección e identificación.	22
3.13.	Métodos de colonización en el laboratorio.	22
3.14.	Especies.	23
4.	Signos clínicos en caninos.	26
4.1.	Signos de lesión cutánea.	26
4.1.1.	Formas localizadas.	26
4.1.2.	Formas generalizadas.	26
4.2.	Signos clínicos inespecíficos.	28
4.3.	Signos clínicos específicos.	29
5.	Transmisión.	30
6.	Factores de riesgo.	31
7.	Reservorios.	31
7.1.	Reservorio primario.	31
7.2.	Reservorio secundario.	32
7.3.	Reservorio incidental (Hospederos paraténicos).	32
8.	Reportes de especies de <i>Leishmania spp.</i>	33

8.1.	América del norte.	34
8.2.	América del centro.	35
8.3.	América del sur.	37
9.	Enfermedad en el hombre.	42
9.1.	Leishmaniasis Cutánea (LC).	42
9.2.	Leishmaniasis Visceral (LV).	44
9.3.	La leishmaniasis y el sida.	45
10.	Patogenia.	46
10.1.	Inoculación.	46
10.2.	Inflamación.	46
10.3.	Internalización de <i>Leishmania</i> .	46
10.4.	De promastigotes a amastigotes.	47
10.5.	Diseminación de amastigotes.	47
10.6.	Inmunocomplejos Circulantes.	48
10.7.	Patogenia del daño renal.	48
10.8.	Lesiones.	50
	10.8.1. Lesiones Macroscópicas.	50
	10.8.2. Lesiones Microscópicas.	51
11.	Respuesta inmune.	55
12.	Diagnóstico.	60
12.1.	Patología clínica.	60
	12.1.1. Hemograma.	60
	12.1.2. Panel Bioquímico Sanguíneo.	61
	12.1.3. Urianálisis.	63
12.2.	Pruebas parasitológicas.	64
	12.2.1. Frotis de lesión.	64
	12.2.2. Aislamiento en medios de cultivo.	65
	12.2.3. Aislamiento en animales de laboratorio.	66
	12.2.4. Histopatología.	67
	12.2.5. Xenodiagnóstico.	67
12.3.	Pruebas serológicas.	68
	12.3.1. Prueba de Inmuno Fluorescencia Indirecta (IFI).	69
	12.3.2. Técnica de Inmunoabsorción Enzimática (ELISA).	69

12.3.3. Prueba Inmunocromatográficas.	70
12.4. Prueba de Hipersensibilidad Retardada o Intradermorreacción de Montenegro (IDR).	71
12.4.1. Aplicación y lectura.	71
12.4.2. Interpretación de los resultados.	72
12.5. Identificación de las diferentes especies de <i>Leishmania spp.</i>	73
12.5.1. Métodos extrínsecos.	73
12.5.2. Métodos intrínsecos.	74
12.5.2.1. Técnicas de caracterización fenotípica.	74
a) Caracterización de isoenzimas: zimodemos.	74
b) Anticuerpos monoclonales.	75
12.5.2.2. Técnicas de caracterización genotípica.	76
a) Hibridación con sondas de ADN.	76
b) Análisis del polimorfismo en el tamaño de los fragmentos de restricción (RFLP): Esquizodemos.	77
c) Reacción en cadena de la polimerasa (PCR).	78
d) Variantes de la PCR.	79
12.6. Diagnóstico diferencial.	80
12.7. Coinfecciones.	81
13. Tratamiento.	82
13.1. Antimoniales pentavalentes.	82
13.2. Anfotericina B.	85
13.3. Alopurinol.	86
13.4. Paramomicina (Aminositidina).	87
13.5. Pentamidina.	87
13.6. Miltefosina.	87
13.7. Sitamaquina (WR6026).	88
13.8. Ketoconazol.	89
13.9. Metronidazol.	89
13.10. Inmunomoduladores.	89
13.10.1. Fármacos inmunosupresores.	89
13.10.2. Fármacos inmunoestimulantes.	90
13.11. Manejo del paciente con leishmaniosis y enfermedad renal.	91
13.11.1. Determinación de la PAS.	91
13.11.2. Ecografía renal.	92
13.11.3. Clasificación de según la severidad de la ERC.	92
13.11.4. Fármacos.	94

13.11.5. Dieta.	95
13.12. Seguimiento.	96
14. Impacto en salud pública.	96
15. Medidas de prevención y control.	97
15.1. Evaluación del riesgo de transmisión.	97
15.1.1. Factores dependientes del vector.	97
15.1.2. Factores dependientes del reservorio.	97
15.1.3. Receptividad del humano a la infección.	98
15.2. Educación Sanitaria.	98
15.3. Medidas de protección individual.	98
15.3.1. Interceptación del contacto con el hospedador.	98
15.3.1.1. En seres humanos.	98
15.3.1.2. En caninos.	99
15.4. Inmunoprofilaxis.	101
15.4.1. Vacunas muertas o inactivadas.	102
15.4.2. Vacunas vivas clásicas.	102
15.4.3. Vacunas vivas recombinantes.	103
15.5. Etapas del control.	104
15.4.1. Fase de preparación.	104
15.4.2. Fase de ataque.	104
a) Reducción vectorial químico: Fumigación.	104
b) Eutanasia.	105
15.4.3. Fase de consolidación.	106
15.4.4. Fase de mantenimiento.	106
III. CONCLUSIONES	107
IV. RECOMENDACIONES	108
V. BIBLIOGRAFÍA	109

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1. Huacos Mochicas con lesiones típicas de leishmaniasis.
- Figura 2. Metaciclogénesis de *Leishmania sp.*
- Figura 3. Ciclo Biológico de *Leishmania spp.*
- Figura 4. *Leishmania* amastigote y promastigote.
- Figura 5. Ciclo Biológico de *Lutzomyia spp.*
- Figura 6. Huevos de *Leishmania sp.*
- Figura 7. Larva y Pupa de *Lutzomyia sp.*
- Figura 8. Tracto alimentario de *Lutzomyia sp.*
- Figura 9. *Lutzomyia spp.*
- Figura 10. Genitales de *Lutzomyia sp.*, hembra y macho.
- Figura 11. Trampa miniatura tipo CDC.
- Figura 12. Vaso de crianza de *Lutzomyia sp.*
- Figura 13. Lesión cutánea en el punto de la picadura del vector.
- Figura 14. Alopecia e hiperqueratosis.
- Figura 15. Lesiones nodulares en oreja de canino.
- Figura 16. Ulceras en piel de orejas de canino.
- Figura 17. Caninos con onicogripos.
- Figura 18. Epistaxis y Caquexia.
- Figura 19. Queratoconjuntivitis seca y blefaritis.
- Figura 20. Distribución por Departamentos en Perú de leishmaniasis.
- Figura 21. Distribución Geográfica de *Lutzomyia sp.* en Perú.
- Figura 22. Interacción de un macrófago con varios promastigotes.
- Figura 23. Inflamación en dermis.
- Figura 24. Hiperplasia epitelial.
- Figura 25. Glomérulo esclerosis.
- Figura 26. Depósitos coloreados en riñón.
- Figura 27. Citología de ganglio linfático.
- Figura 28. Reacción inmunitaria a *Leishmania*.
- Figura 29. ELISA empleando el antígeno rK39.
- Figura 30. Prueba de Aglutinación Directa y Test rK39 inmunocromatografía.
- Figura 31. Aplicación y lectura de la leishmanina.
- Figura 32. Lesiones metastásicas en *Mesocricetus auratus*.
- Figura 33. Hipercogenicidad de la corteza renal.
- Figura 34. Collares impregnados con Deltametrin.
- Figura 35. Insecticidas tópicos en Spot on.
- Figura 36. Vacuna contra la leishmaniasis canina.

LISTA DE TABLAS

- Tabla 1. Especies de *Leishmania* spp.
- Tabla 2. Métodos extrínsecos para identificar especies de *Leishmania*.
- Tabla 3. Insecticidas tópicos para el control de Leishmaniasis canina.

LISTA DE ABREVIACIONES

aC antes de Cristo.
dC después de Cristo.
ADN ácido desoxirribonucleico.
ARN ácido ribonucleico.
CD (*cluster of differentiation*) grupo de diferenciación.
DC (*dendritic cell*) célula dendrítica.
ELISA *enzyme-linked immunosorbent assay*.
ESPECIE sp.
ESPECIES spp.
HSP (*heat shock protein*) proteínas de shock térmico.
IFI (*immunofluorescence indirect*) inmuno fluorescencia indirecta.
IL interleucina.
kb kilo base.
kDa kilo Dalton.
LC leishmaniasis cutánea.
Lcan leishmaniasis canina.
L. Leishmania.
LMC leishmaniasis mucocutánea.
LPG (*lipophosphoglycan*) lipofosfoglicano.
LDPK leishmaniasis dérmica post kala-azar.
Lu. Lutzomyia.
LV leishmaniasis visceral.
MHC (*major histocompatibility complex*) complejo mayor de histocompatibilidad.
NOS óxido nítrico sintetasa.
pb pares de bases.
PCR (*polymerase chain reaction*) reacción en cadena de la polimerasa.
MP (*peritrophic membrane*) membrana peritrófica.
Th T (*helper cell*) célula T auxiliar.
OMS Organización mundial de la salud.

I. INTRODUCCIÓN

La leishmaniasis es una infección parasitaria que afecta a humanos, animales domésticos y silvestres. Es causada por los miembros del género *Leishmania* que realizan parte de su ciclo biológico en un hospedador vertebrado, en forma aflagelar o amastigote. Y completan su desarrollo en el tubo digestivo del hospedador invertebrado, en su forma flagelar o promastigote, estos son flebotomos del género *Phlebotomus* en el Viejo Mundo y *Lutzomyia* en el Nuevo Mundo (Miró, 2007b; Baneth, 2006, 2007).

En varios países de América el principal vector de leishmaniasis visceral es *Lutzomyia longipalpis*, su distribución abarca desde el sur de México hasta el norte de Argentina y es capturada dentro y fuera de las viviendas humanas (Milleron *et al.*, 2004; Lainson y Rangel, 2005; González *et al.*, 2006; Ramírez *et al.*, 2006; Dantas, 2008; Diniz *et al.*, 2008).

La leishmaniasis está distribuida en el sur de Europa, África, Asia, América del sur, centro y recientemente en Estados Unidos y Canadá (Baneth, 2007). En el mundo hay 14 millones de personas infectadas y cada año se registran 2 millones de casos nuevos. De ellos 500,000 viscerales, que provoca más de 50,000 defunciones; y 1'500,000 casos cutáneos. La población en riesgo se eleva a 350 millones de personas y sólo en 33 de los 88 países endémicos la leishmaniasis es una enfermedad de notificación obligatoria (OMS, 2007).

Los cambios ecológicos, demográficos y medioambientales relacionados con nuevos proyectos de desarrollo, urbanización y grandes movimientos de población están conduciendo a un aumento a escala mundial de consecuencias sanitarias adversas donde el desarrollo del flebotomo vector se ve favorecido, de tal manera que la aparición de casos parece estar relacionada con la continua deforestación y la expansión urbana, que se ha intensificado en los últimos años. Posicionándose como un problema de salud pública cada vez más acusado en muchas regiones de Latinoamérica, especialmente en Brasil, Colombia y Venezuela, donde anteriormente no se encontraba (Desjeux, 2002; Rondón, 2006; ENY-740S, 2007; Sousa y Pearson, 2009).

El rol del perro (*Canis familiaris*), como reservorio en la transmisión doméstica y peri doméstica de la leishmaniasis humana ha sido reconocida desde que Charles Nicols, el ganador al premio Nobel, descubrió la enfermedad en perros en Tunisia en 1908. El número de perros infectados en Sud América es estimado en millones con una alta tasa de infección en algunas

áreas de Brasil y Venezuela (Killick-Kendrick, 1999; Baneth, 2006, 2007; Sousa y Pearson, 2009). La leishmaniasis canina es una enfermedad zoonótica que existe en cerca de 50 de los 88 países donde la leishmaniasis humana está presente y resulta frecuentemente mortal en humanos y perros no tratados (Baneth, 2006; Coura *et al.*, 2006).

En la población canina afectada los signos clínicos son muy variables, podemos observar desde animales aparentemente sanos, hasta otros que manifiestan varios signos clínicos. Esto se debe a la complejidad de los mecanismos patogénicos dependientes del parásito y a la marcada individualidad de la respuesta inmunitaria del hospedador (Miró, 2007b).

Los términos que utilizaremos como abreviación para leishmaniasis canina será Lcan, en esta especie la piel se ve afectada en el transcurso de la diseminación de la enfermedad a los órganos internos, manifestándose ambas formas de la enfermedad a la vez (Killick-Kendrick, 1999; Baneth, 2006; Miró, 2007b; OIE, 2008). Para designar la enfermedad según sus manifestaciones clínicas en humanos, usaremos las siguientes abreviaciones: leishmaniasis cutánea (LC), leishmaniasis mucocutánea (LMC) y leishmaniasis visceral (LV) (Killick-Kendrick, 1999; Baneth, 2006).

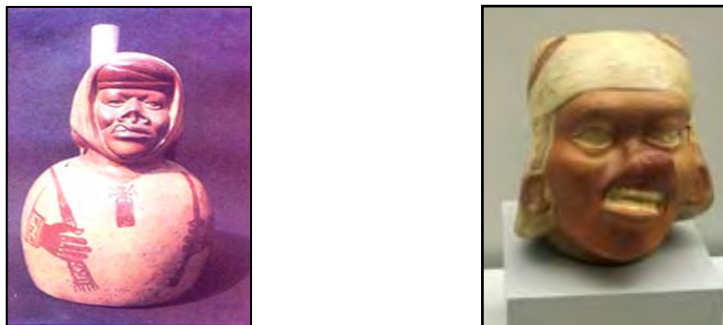
La presente monografía pretende ser un documento actualizado donde se revisa la enfermedad en todos sus aspectos, para aumentar los conocimientos existentes sobre esta zoonosis parasitaria de creciente interés en los últimos veinte años.

II. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

1. Generalidades

La antigüedad de la leishmaniasis en el continente americano precede a la llegada de los españoles, esta hipótesis es apoyada por la cerámica de arcilla, “huacos” antropomorfos, encontrados en las zonas donde se desarrollaron la cultura Mochica (100aC-700dC) y la cultura Chimú (1400-1470dC), que representan secuelas destructivas y deformantes de labios y de nariz. En este sentido en 1913 la Comisión de la Universidad de Harvard concluye que la “Uta” es una leishmaniasis de variedad cutánea y la “Espundia” de tipo mucocutánea (MINSA, 2000; Gonzáles y Zerpa, 2004; Collins, 2008).

Figura 1. Huacos Mochicas con lesiones típicas de leishmaniasis



(Fuente: Burstein, 2005; OMS, 2009)

En 1911 Gaspar Vianna al examinar improntas de las lesiones describe las características morfológicas del parásito, incluyendo el kinetoplasto, usando tinción Wright y Giemsa. Propone el nombre de *Leishmania braziliensis* para denominar al agente que produce la leishmaniasis tegumentaria americana, diferenciándola de la *L. tropica* e introduce la terapia con antimoniales (tartrato de amonio y potasio) en Brasil; en 1913 Pedroso en Brasil reporta por primera vez un perro infectado por *Leishmania*; en 1924 Montenegro presenta su trabajo sobre intradermoreacción en el Brasil (MINSA, 2000; Baneth, 2002; Sousa y Pearson, 2009).

La primera descripción con relación al vector fue realizada en 1912 por Lutz y Neiva reconociendo a *Lutzomyia longipalpis*. Por el año de 1934 Henrique Penna encontró que 41

personas en Brasil habían muerto por leishmaniasis visceral al examinar las muestras de hígado; poco después de este acontecimiento Carlos Chagas también en Brasil, realiza la primera descripción clínica de un caso de leishmaniasis visceral americana e hizo una observación importante donde demostró que *Lutzomyia longipalpis* era el insecto que con más frecuencia picaba al humano para alimentarse de su sangre, por lo que se sospechó que actuaba como vector, se denominó al parásito causante como *Leishmania chagasi* por Cunha y Chagas en 1937 (Lainson y Rangel, 2005; Watts *et al.*, 2005; Diniz *et al.*, 2008).

Hacia el año 1984 se estimaba que un 90% de los casos reportados en el Nuevo Mundo provenían de Brasil (Lainson y Rangel, 2005).

2. Etiología

2.1. Taxonomía

Reino	Protista	Haeckel, 1866
Subreino	Protozoa	Goldfuss, 1817
Filo	<i>Sarcomastigophora</i>	Honigberg–Balamuth, 1963
Subfilo	<i>Mastigophora</i>	Deising, 1866
Clase	<i>Zoomastigophora</i>	Calkins, 1909
Orden	<i>Kinetoplastida</i>	Honigberg, 1963
Suborden	<i>Trypanosomatina</i>	Kent, 1880
Familia	<i>Trypanosomatidae</i>	Doflein, 1901
Género	<i>Leishmania</i>	Ross, 1903 (OPS, 1996).

En el género *Leishmania* existe más de 17 especies conocidas, todas ellas parásitos obligados (Croft *et al.*, 2006). La *Leishmania* fue descrita en 1903 por Leishman y Donovan en la India y simultáneamente por Wright en un niño armenio (García, 2005).

2.2. Ciclo biológico

Leishmania es un parásito digénico porque realiza parte de su ciclo biológico en el tubo digestivo del hospedador invertebrado en forma flagelada o promastigote (*gr. mastigos*, látigo) y en forma aflagelada o amastigote en el hospedador vertebrado (OIE, 2008).

a) Promastigote

Para alimentarse, la hembra del insecto vector pica al mamífero reservorio, los macrófagos contaminados de la piel pasan al tracto digestivo del insecto donde se produce su ruptura y se transforman en promastigotes dentro de las 24-48 horas tras la picadura mediante el mecanismo de síntesis de proteínas de choque térmico (Diniz *et al.*, 2008). Inician una rápida multiplicación dentro del tubo digestivo del vector (metacicloogénesis), que dura aproximadamente 10 días. De

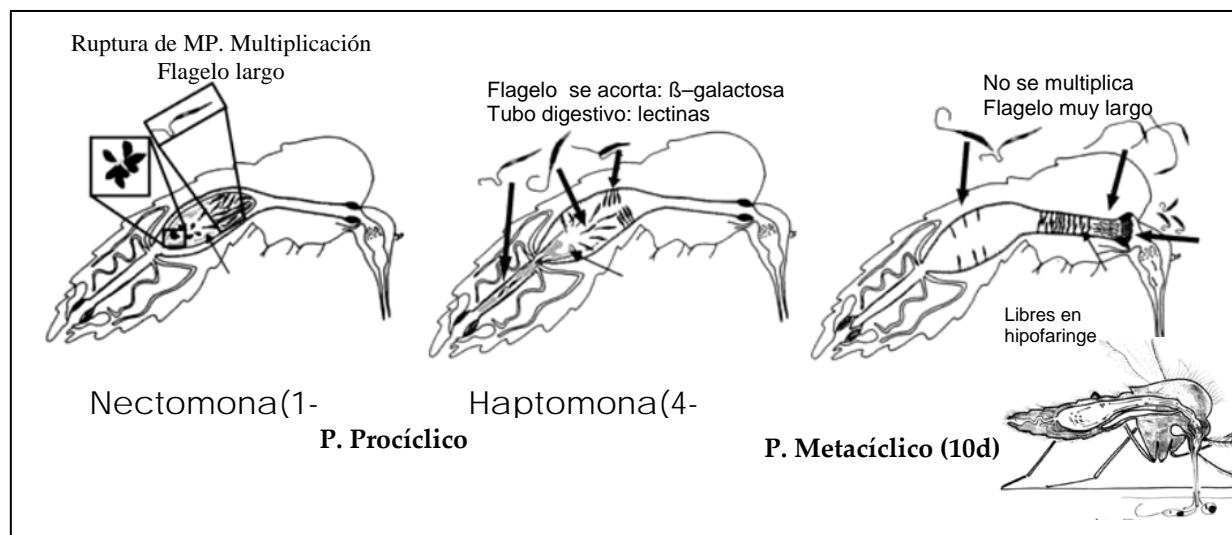
forma simultánea el insecto comienza a formar la membrana peritrófica (MP) en la primera hora después de la ingesta, constituida por proteínas, glicoproteínas y microfibras de quitina embebidas en una matriz de proteoglicano, con el fin de digerir la sangre ingurgitada (Niederwieser, 2004).

Las proteínas de la sangre ingerida son digeridas en 48–72 horas, las moléculas que cubren la superficie de *Leishmania* soportan la acción lítica de las enzimas que el insecto produce para digerir la sangre, éstas son la proteasa gp63 (digiere la hemoglobina) y principalmente el lipofosfoglicano (LPG), además el parásito sintetiza enzimas quitinolíticas para poder escapar de la MP del estómago y situarse en un punto más ventajoso para ser transmitido (Alvar, 2001; Nieves y Pimenta, 2002).

El género *Leishmania* se divide en los subgéneros *Viannia* y *Leishmania*, por que tienen diferencias en el desarrollo dentro del hospedero invertebrado. Los primeros se reproducen en el píloro y por detrás del mismo y se les llama *Peripylaria*, mientras que el subgénero *Leishmania* se reproduce en el segmento anterior al píloro, es decir próxima a la probóscide y se les llama *Suprapylaria* (Nieves y Pimenta, 2002; García, 2005; Baneth, 2006).

Tres días después de que el vector ingiere la sangre, las formas procíclicas van cambiando y tienen gran movilidad y rápida división, ésta es la fase del ***promastigote nectomona*** que ahora empieza la ruptura de la MP (Alvar, 2001). Después de una intensa multiplicación por fisión binaria en el píloro o en el segmento anterior de él, se siguen multiplicando en las porciones anteriores del intestino y logran avanzar insertando el flagelo entre las microvellosidades del intestino medio, para lograrlo achata el flagelo para ganar superficie de contacto, en un proceso en forma de ruedas dentadas de unión y desunión de azúcares del LPG (principalmente la β -galactosa) concentrados en la punta del flagelo que se une con las lectinas del tubo digestivo, así se convierte en el ***promastigote haptomona*** (Pereira, 2002). Esto previene que el parásito sea excretado junto con la sangre digerida al día 7 post alimentación. Por otro lado existe un alto nivel de especificidad entre vector y especie de *Leishmania*, de modo que una especie de flebótomo sólo es susceptible a una o algunas especies de *Leishmania*, pues en el vector equivocado, la *Leishmania* sería excretada con la sangre digerida. Debido a que la MP tiene una composición química propia para cada especie de flebótomo y la constitución de gp63 y del LPG también son propios de cada especie de *Leishmania*, estas diferencias determinan también que dentro de la misma especie haya estirpes de flebótomos refractarias o susceptibles a ser parasitadas por *Leishmania* (Niederwieser, 2004).

Figura 2. Metaciclologénesis de *Leishmania* sp.



(Fuente: Niederwieser, 2004)

Hacia los 10 días después de haber infectado al insecto, el promastigote pierde la adherencia al cambiar la configuración del LPG, el flagelo se hace muy largo y el cuerpo corto, deja de multiplicarse pero recupera la infectividad se encuentra completamente libre en el proventrículo e hipofaringe del vector, listo para ser inoculados cuando se produzca la siguiente ingesta de sangre; este estadio es el **promastigote infectivo o metacíclico** (Alvar, 2001; Diniz *et al.*, 2008).

Todo éste desarrollo del parásito dentro del vector tiene rangos de 4 a 25 días (Milteforan®, 2007).

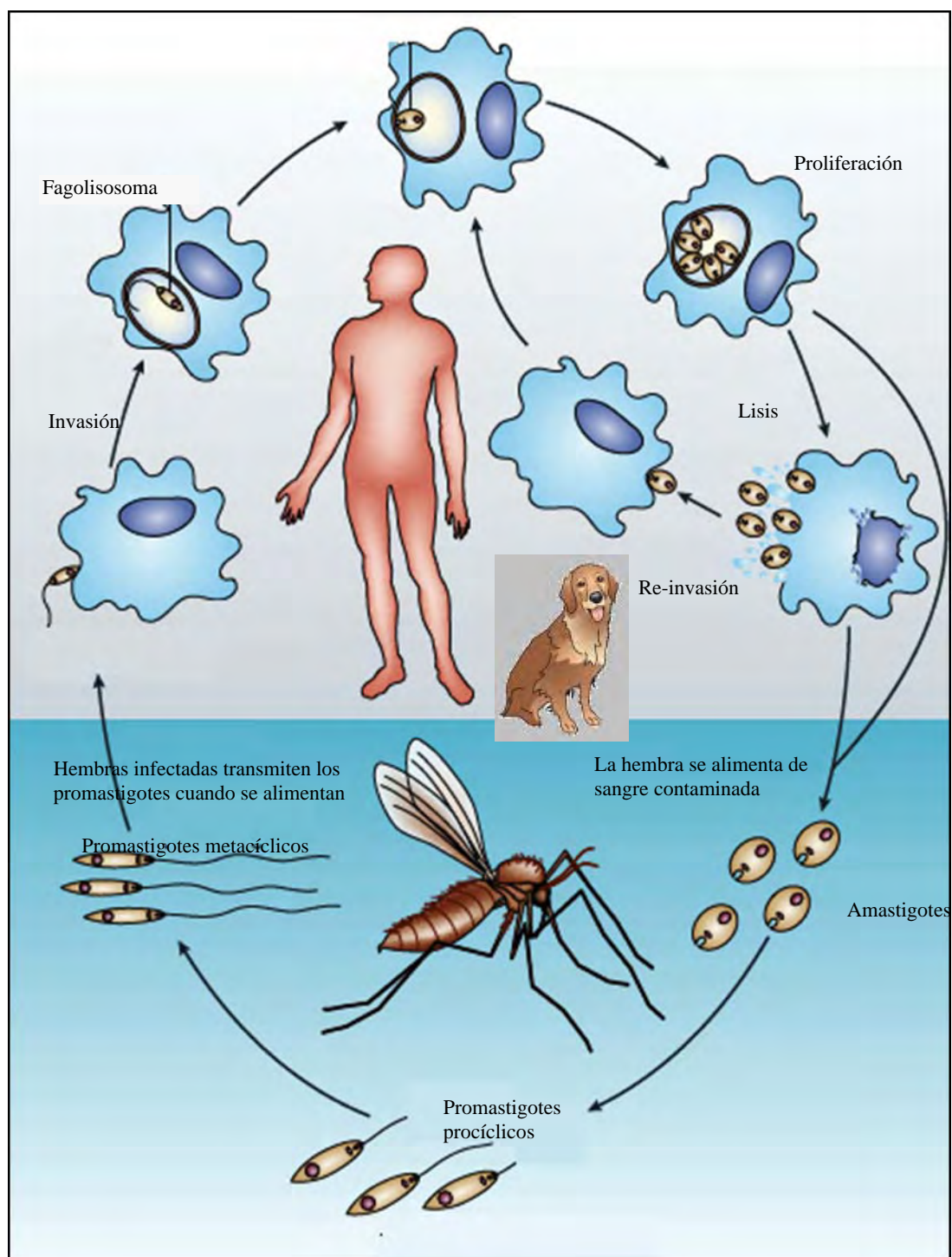
La válvula estomodeal del flebótomo se ve dañada por un gel viscoso que él excreta para restringir su movilidad y también por las enzimas quitinolíticas producidas por los parásitos, perdiendo funcionalidad y permitiendo la salida de promastigotes metacíclicos durante la alimentación. Los promastigotes metacíclicos rellenan la faringe, probóscide y glándulas salivales del flebótomo y permanecen allí hasta una nueva picadura (Killick-Kendrick, 2002).

b) Amastigote

Cuando un flebótomo parasitado ingurgita sangre de un vertebrado, inocula con su saliva los promastigotes metacíclicos presentes en la probóscide, estos promastigotes empiezan el ataque y penetración por fagocitosis en un macrófago, una vez dentro del macrófago y antes de las primeras 24 horas, se transforman nuevamente en amastigotes y son englobados en una vacuola parasitófora o fagosoma, cuando el macrófago queda repleto de amastigotes, se rompe y se liberan los amastigotes al espacio extracelular, donde los amastigotes parasitados serán nuevamente fagocitados por un macrófago libre. La ingestión de un macrófago parasitado por un flebótomo al ingurgitar sangre dará lugar a un nuevo ciclo celular (Ferrer, 2002; García, 2005; Zegarra y Sánchez, 2005; Roberts, 2006).

El período de incubación puede ser desde 3 meses hasta varios años (Baneth, 2007; Milteforan®, 2007).

Figura 3. Ciclo Biológico de *Leishmania* spp.



(Fuente: Chappuis *et al.*, 2007)

2.3. Morfología

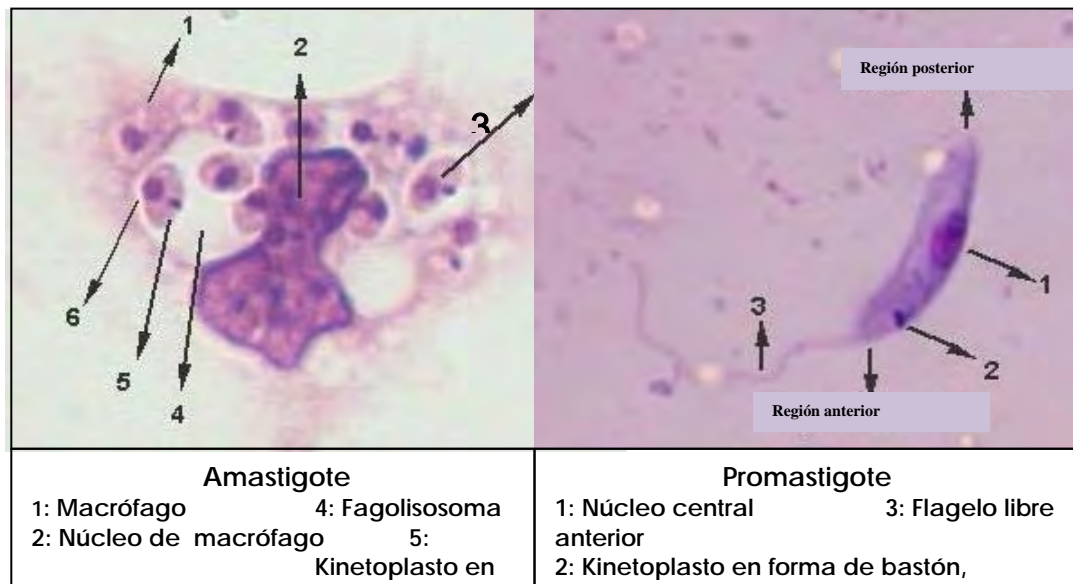
Amastigote

Es la forma intracelular, se encuentra dentro del sistema reticuloendotelial del mamífero hospedero así como en frotis y biopsias. Son pequeños cuerpos redondeados u ovalados (cuerpos de Leishman-Donovan) de 1,5–3 x 2,5–6,5 µm en los que se identifican: un núcleo, un kinetoplasto puntiforme y un flagelo interno, éste último sólo visible al microscopio electrónico, están localizados en las vacuolas del citoplasma de los macrófagos. El organismo tiene un núcleo relativamente grande y un kinetoplasto que consiste en un cuerpo alargado y un cuerpo basal puntual. La tinción con Giemsa o Wright de los frotis obtenidos de las lesiones cutáneas revela un citoplasma azul claro, mientras que el núcleo y kinetoplasto se tiñen de púrpura (OIE, 2008).

Promastigote

Es la forma extracelular, se encuentra en el interior del intestino del vector y en los medios de cultivo. Es alargado de 15–20 x 1,5–3,5 µm con un único flagelo externo anterior de 15–28 µm de longitud, que sale de las proximidades del kinetoplasto en la parte anterior. El núcleo se sitúa centralmente (OIE, 2008).

Figura 4. *Leishmania* amastigote y promastigote



(Fuente: OIE, 2008)

2.4. Organización celular

Membrana celular: Es una bicapa lipídica convencional, pero en su superficie se han identificado una serie de moléculas que actúan como factores de virulencia y como moléculas de evasión contra el sistema inmune del hospedero. Por debajo de ella se encuentran los microtúbulos (Alvar, 2001; Stuart *et al.*, 2008).

Glucocálix: Es una cubierta densa de gluconjugados que actúa como interfase entre el parásito y el medio externo en el que se encuentre; tanto en el promastigote (en el tubo digestivo del flebótomo) como en el amastigote (vacuola parasitófora del macrófago). Los glucoconjugados son clave para la supervivencia del parásito, las más abundantes son (Alvar, 2001):

- **La glicoproteína de 63 kDa (gp63):** Es una metaloproteasa de zinc, abundante en la superficie del promastigote, lo protege de las enzimas proteolíticas del flebótomo y para digerir la hemoglobina en el estómago del vector. En el amastigote aparece dentro de la vacuola parasitófora frente a las enzimas lisosomales del macrófago. Penetración en el macrófago a través del receptor C3. Regulada por tres clases de genes según se trate de promastigotes en fase de crecimiento logarítmico, estacionario o amastigotes (Niederwieser, 2004; Martínez *et al.*, 2008)
- **La glicoproteína de 46 kDa (gp46):** Presente en el subgénero *Leishmania*. Resiste a la acción proteolítica en el macrófago (Alvar, 2001).
- **El LPG:** Resiste a la degradación de hidrolasas lisosomales en el promastigote y en el amastigote. Es el sistema de anclaje del parásito, en el insecto el LPG es más abundante y se deposita en el extremo flagelar para anclarse a los microvilli intestinales del insecto. En el vertebrado fija la fracción C3b del complemento en la superficie del parásito para promover la opsonización y reconocimiento de receptores CR1, CR3 del macrófago y favorece la penetración anclándose a la membrana celular mediante una estructura glucosil-fosfatidil-inositol (GPI) (Gonçalves *et al.*, 2004; Ramírez *et al.*, 2006).

La bolsa flagelar: De donde nace el flagelo. Hay una mayor concentración de moléculas propias del glucocálix (Alvar, 2001; Stuart *et al.*, 2008). La proteína de membrana del kinetoplasto 11 (KMP11) de *L. donovani* pesa 11kDa, también está localizada en la bolsa flagelar y tiene una alta expresión en todos los estadios del vector (Chandra *et al.*, 2009).

Flagelo: En el caso del promastigote, la membrana celular se invagina en una bolsa para alojar al flagelo, constituido por nueve pares de microtúbulos periféricos y uno central, siendo sus componentes principales la actina y tubulina. Tiene una longitud promedio de 20 µm de longitud. El flagelo establece contacto con la membrana de la bolsa flagelar mediante hemidesmosomas (Alvar, 2001).

Kinetoplasto: Al ser miembro del orden *Kinetoplastida*, posee una compacta red de ADN conocida como kinetoplasto (ADNk). Es un ADN extranuclear, equivalente al genoma mitocondrial de los mamíferos. El ADNk está compuesto de dos componentes principales, los maxi y mini círculos. Se colorea intensamente y tiene la forma de una barra (Niederwieser, 2004; Oshaghi *et al.*, 2008).

El núcleo: Está formado por una doble membrana en cuyo interior se encuentra el nucléolo y la cromatina, condensada en histonas (Alvar, 2001).

Citoplasma: Se encuentran los retículos endoplásmico liso y rugoso en conexión con el núcleo, y los ribosomas formando cadenas arrosariadas, independientes de los retículos. El aparato de Golgi está compuesto por media docena de sacos en conexión con unas vacuolas; además hay lisosomas, vacuolas lisas, enzimas metabólicas, gránulos de iones de Mg^{++} , Ca^{++} y Zn^{++} . En los amastigotes y en los promastigotes más evolucionados, sobre todo los metacíclicos, aparece un orgánulo lisosomal voluminoso llamado megasoma, cargado con una serie de cisteína proteinasas, enzimas proteolíticas de 18 a 31 kDa, asociadas con la capacidad invasiva (Alvar, 2001).

Retículo endoplásmico: En eucariotas la translocación de proteínas se lleva a cabo en esta organela, el estudio de las secuencias del ARN permite la discriminación entre especies (Zelazny *et al.*, 2005).

Microtúbulos subpeliculares: Se disponen en espiral debajo de la membrana celular y son los que le confieren una morfología relativamente estable y cierto movimiento contráctil (Alvar, 2001).

Corpúsculo basal: Es el conjunto de microtúbulos (Alvar, 2001).

2.5. Variación en la expresión proteica

El paso de promastigote a amastigote supone un cambio morfológico drástico por lo que es una situación de estrés, para ello se realiza la inducción de unas proteínas estructurales y sustitución de otras. Entre ellas tenemos a (Alvar, 2001):

Las proteínas ribosomales: Intervienen en la fase de elongación de la síntesis de proteínas e inducen la respuesta humoral. (ej., proteína ribosomal LelF) (Dantas, 2008).

La familia de las histonas: Son importantes en la organización y función del ADN nuclear que también son reconocidas en los sueros de enfermos con diferentes formas de leishmaniasis y en Lcan (Alvar, 2001).

La familia de las kinesinas (KIF): Actúan como “motor” del parásito y también tienen gran capacidad de inducir la respuesta celular (Dey *et al.*, 2008).

La proteína homóloga a los receptores de la kinasa C activada LACK (*Leishmania* activated C kinase): Interviene en muchas funciones de regulación celular, como por ejemplo son proteínas antioxidantes. De sumo interés, por ser claves en la adaptación a los distintos ambientes y jugar un papel importante en la virulencia del parásito (Sacks *et al.*, 2002).

Las proteínas de choque térmico (HSP): Los genes que regulan la expresión de las proteínas HSP son inducibles por el cambio de temperatura en el insecto poiquilotermo (entre 22 y 28°C) y el hospedador vertebrado homeotermo (37°C). Las proteínas HSP60, HSP70 y HSP83 son sintetizadas durante el estrés térmico pero a partir de 42°C se interrumpe definitivamente su síntesis. El choque térmico no es el único mecanismo que provoca la expresión proteica de las HSP pues pueden contribuir otros fenómenos, como la propia fagocitosis del parásito en el macrófago. El hecho de que la expresión de las HSP sea rápida y a concentraciones relativamente altas dentro del macrófago, sugiere su participación en patogénesis (Alvar, 2001; Sacks *et al.*, 2002).

2.6. Alimentación

Leishmania se alimenta heterotróficamente. El metabolismo de los carbohidratos es incompleto hasta ácidos orgánicos y CO₂ mediante fermentación aerobia por glucolisis y por la ruta de las pentosas fosfato. La glucosa es utilizada como fuente energética, el azúcar es acumulado a través de la membrana gracias a un sistema de proteínas transportadoras hacia los “glucosomas” que son peroxisomas modificados para actuar en la glucolisis, ocupan el 4% del volumen del parásito lo que da idea de la importancia que tienen (Stuart *et al.*, 2008). El aporte energético más importante se hace, sin embargo, a partir de los carbonos de los aminoácidos. En lo que se refiere a los ácidos nucleicos, *Leishmania* no es capaz de sintetizar *de novo* las purinas aunque sí las pirimidinas; entre los metabolitos más importantes se encuentran las putresceínas y espermidinas (Alvar, 2001).

2.7. Reproducción

La reproducción asexual en los promastigotes, excepto sus formas metacíclicas, es mediante la división por fisión binaria, los amastigotes también pueden dividirse por fisión binaria o por fisión múltiple, que puede comprender varias escisiones binarias sucesivas. Al igual que otros protozoos parásitos también existe reproducción sexual, mediante el intercambio genético (Minero *et al.*, 2004; Stuart *et al.*, 2008). Una serie de hechos que así lo indican:

a) *Leishmania* es diploide

Cuando se quiere reemplazar un gen para que el parásito pierda su virulencia y ser así utilizado como vacuna, o para hacerlo más vulnerable a la acción de un medicamento, hace falta inactivar ambos alelos para lograr un mutante nulo homocigoto (Alvar, 2001).

b) La formación de híbridos

No es incompatible con la hipótesis de una población con estructura clonal, ya que esta hipótesis no implica que el sexo esté totalmente ausente. Esto manifiesta sólo que la recombinación no es lo suficientemente frecuente para romper el patrón prevalente de la estructura clonal de la población. Favorece esta hipótesis los híbridos:

L. (V.) panamensis/guyanensis reportados en Zumba, Ecuador (OPS, 1996)

L.(V). braziliensis/panamensis reportados en Nicaragua (OPS, 1996)

L.(V). braziliensis/guyanensis (Bañuls *et al.*, 1999) y

L.(V). peruviana/braziliensis en Huánuco, Perú (Alvar, 2001).

Sin embargo, los intentos de formar híbridos en el vector, en definitiva, donde se podrían entrecruzar las cepas en la naturaleza, han fracasado siempre (Alvar, 2001).

c) Se considera que una especie es clonal cuando los descendientes son idénticos a los progenitores

Esta hipótesis se apoya en el hecho de que, en cada especie, el cariotipo está representado por un grupo reducido de cromosomas altamente conservados y un juego amplio de cromosomas variables, únicos para cada aislado, la clonalidad no implica la ausencia de recombinaciones genéticas en poblaciones naturales del parásito, si no que éstas no son suficientemente frecuentes para romper la estructura de la población clonal (Alvar, 2001).

2.8. Genoma

Leishmania presenta material genético diploide, el cual está organizado en cromosomas. El cariotipo está conformado por 36 pares de cromosomas (García, 2005).

a) ADN genómico (ADNg)

Se encuentra localizado en el núcleo celular y es el encargado de la multiplicación del parásito, contiene más del 80% del genoma total (Alvar, 2001). Algunas secuencias se han identificado y descrito como marcadores moleculares en la identificación de especies (Orué *et al.*, 2008).

b) ADN kinetoplástico (ADNk)

Está constituido por un disco visible al microscopio óptico que contiene 107 pb. Representa hasta el 20% del ADN del parásito. Sus dos componentes, los maxi y minicírculos, están concatenados covalentemente. Actualmente se usa como una herramienta importante en la clasificación e identificación del organismo (Oshaghi *et al.*, 2008).

- **Los maxicírculos:** Son elementos genéticos de 30 a 40 kb y son 50 maxicírculos, los cuales poseen una región conservada y otra variable. Se les atribuye la misma función que al ADN mitocondrial de otros sistemas celulares como es contener los genes que codifican los ARN ribosomales y algunas proteínas de la mitocondria (Alvar, 2001).
- **Los minicírculos:** Son las moléculas más pequeñas con un tamaño que oscila entre 450 y 2500 pb dependiendo de la especie. El descubrimiento de las secuencias de los minicírculos hace notar que son únicas por especie, lo que hace posible una prometedora solución al problema de caracterización de aislados desconocidos. La combinación de varios primers conteniendo una secuencia conservada del minicírculo del ADNk, a aumentado la sensibilidad del PCR (Kato *et al.*, 2005; Oshaghi *et al.*, 2008). Los minicírculos transcriben ARN guías, encargados de la maduración de los ARN primarios, primer eslabón en la adaptación del protozoo a los distintos medios en los que ha de vivir (Alvar, 2001).

3. Vectores asociados

3.1. Taxonomía

Phylum:	Artrópoda
Clase:	Insecta
Suborden:	Nematocera
Orden:	Díptera
Familia:	<i>Psychodidae</i>
Subfamilia:	<i>Phlebotominae</i> (distribución mundial, en el Nuevo Mundo de 50°39' N hasta 40°S) (MINSA, 2002c).
Género:	<i>Phlebotomus</i> (12 subgéneros en el Viejo Mundo) <i>Lutzomya</i> (25 subgéneros en el Nuevo Mundo con 480 especies, 30 de ellas son vectores demostrados (García, 2005).

3.2. Ciclo biológico

Los flebotomos son insectos con metamorfosis completa (holometábolos), por lo que pasan por diferentes estados de vida: huevo, 4 estadios larvales, pupa y adulto. El desove lo pueden realizar en zonas arenosas, oscuras o poco iluminadas, con humedad relativa alta y ricos en material orgánico para que se puedan alimentar las larvas cuando eclosionen, en cada puesta se depositan de 50 a 100 huevos, según la especie (Alvar, 2001; MINSA, 2002c).

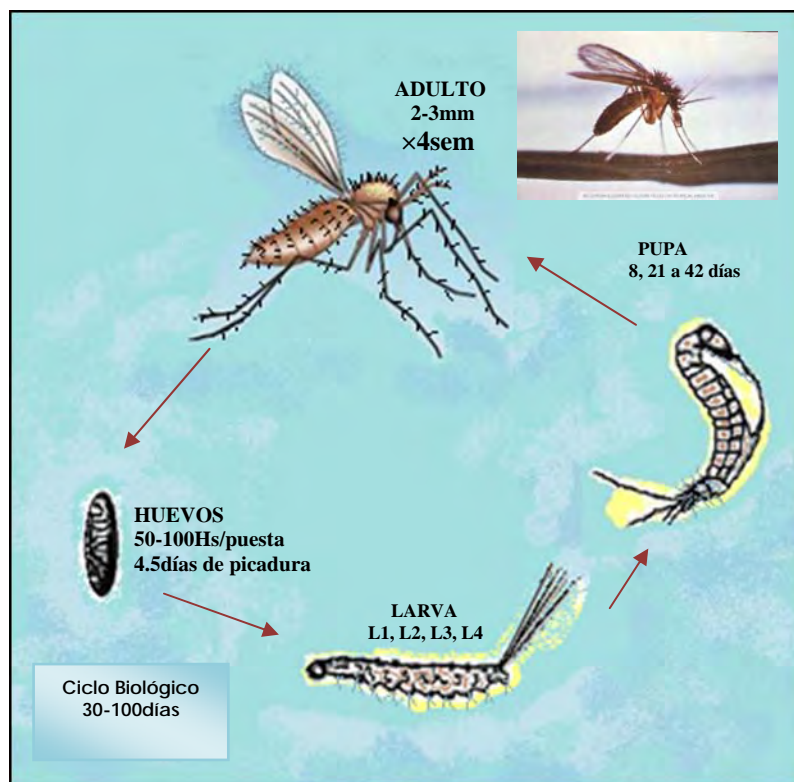
Al cabo de 4 a 15 días eclosiona la larva 1, gracias a un espolón que tiene en su cabeza con el que abre la cáscara, luego pasan por larva 2, 3 y 4. La fase de pupa se observa hacia la tercera semana (8 a 41 días), en condiciones favorables este período se acorta. Y la fase de adultos, viven una media de 4 semanas (MINSA, 2002c; Capelli, 2007). El apareamiento se produce 24 horas después de eclosionar los adultos desde la fase de pupa ya que los machos emplean este periodo para rotar los genitales externos (genitalia) 180° a su posición definitiva, atrayéndose mutuamente por las feromonas y por la diferencia de frecuencias en el batir de las alas durante el cortejo nupcial (Alvar, 2001; MINSA, 2002c).

La población vectorial es mantenida por la larva que en tiempos desfavorables sobreviven en diapausa del cuarto estadio larvario ya que no existe transmisión transovárica (Capelli, 2007; Miró, 2007b).

Según la temperatura y la dieta larvaria, el ciclo biológico completo dura de 30 a 100 días (Alvar, 2001). Por ejemplo a *L. verrucarum* le toma en promedio 63 días en desarrollarse desde huevo a pupa, siendo su temperatura ideal de desarrollo de 21°C ± 1°C (Huarcaya *et al.*, 2004). La pluviosidad afecta de manera importante al hábitat del vector por el efecto que tiene sobre la vegetación, la temperatura y la humedad relativa (Quintero y Rodríguez, 2008).

El ciclo gonotrófico es el tiempo que se tarda entre la ingesta de sangre y la puesta de huevos. La ovoposición se ve mediada por las feromonas que actúan como atractivo y estimulante sexual. Los adultos viven una media de cuatro semanas por lo que realizan el ciclo gonotrófico tres o cuatro veces. Una vez alimentadas, las hembras vuelven a sus refugios naturales para reposar y filtrar la sangre antes de buscar el lugar de ovoposición que sucederá unos 4 a 5 días más tarde. La frecuencia de las picaduras varía de una especie de flebótomo a otra y mientras unas se alimentan una sola vez para cada ovoposición (concordantes gonotróficos), otras se alimentan varias veces en días diferentes (discordantes gonotróficos) (Alvar, 2001). Además, las hembras infectadas tienden a “probar” varias veces cuando pican, posiblemente por las alteraciones producidas por los parásitos que llenan la faringe y probóscide del insecto, dificultando su alimentación normal, lo que le obliga a prodigar el número de picaduras (García, 2005). Una vez que el insecto está infectado, es capaz de transmitir los parásitos durante toda su vida, en cada una de las ingestas que realice (Alvar, 2001).

Figura 5. Ciclo Biológico de *Lutzomyia* spp.



(Fuente: Killick-Kendrick, 1999)

3.3. Comportamiento

El vuelo es corto y silencioso y estudios en túnel de viento sugieren que su máxima velocidad es algo menos de 1 m/s, acostumbran a avanzar dando saltitos en zig-zag. No se suelen alejar de sus lugares de reposo superando en muy raras ocasiones los 500 metros. La mayor parte de flebótomos son fototrópicos, por lo que penetran en las viviendas iluminadas por la noche para alimentarse, a ellas se les denomina endofágicas y son exofágicas cuando pican en el exterior de las viviendas (Roberts, 2006; Miró, 2007b).

3.4. Morfología

a) Huevo

Son ovalados (elípticos) y algo curvos de unas 350-500 μm de largo por 100 μm de ancho, con superficie en forma de escamas, crestas u otras protuberancias que forman patrones típicos de la especie que hacen dibujos de interés taxonómico. El color varía de castaño claro a oscuro (Alvar, 2001; MINSA, 2002c).

Figura 6. Huevos de *Leishmania* sp.



(Fuente: Killick-Kendrick, 1999)

b) Larva

Este estadio comprende cuatro etapas, que se diferencian entre sí por el tamaño, su coloración varía de acuerdo a la especie. Las larvas son pequeñas, alargadas, un tanto aplanadas en sentido dorso ventral, presenta una cápsula cefálica desarrollada. El cuerpo está formado por 12 segmentos: tres torácicos y nueve abdominales. En la parte caudal están presentes cerdas largas, la larva de primer estadio presenta 2 y los siguientes tres estadios 4 cerdas (MINSA, 2002c).

Figura 7. 7a) Larva y 7b) Pupa de *Lutzomyia* sp.



(Fuente: Killick-Kendrick, 1999; MINSA, 2002c)

c) Pupa

Es de tamaño pequeño (2 mm), con forma cilíndrica, mantiene una posición erecta al fijarse por la parte posterior, su color varía de blanco a pardo oscuro (MINSA, 2002c).

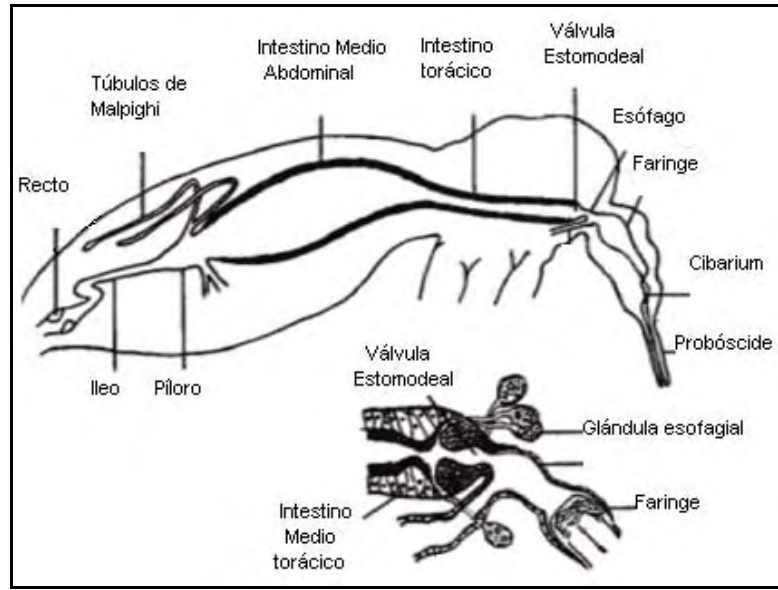
d) Adulto

Son de 1–3 mm de longitud, tienen el cuerpo, alas, patas, palpos y antenas cubiertos de pelos finos (cortos y largos), observándose también escamas pequeñas. El color del cuerpo varía desde claro a pardo, la porción dorsal del tórax muestra mayor diversidad de coloración (MINSA, 2002c; Ramírez *et al.*, 2006).

La cabeza es ligeramente piriforme en vista frontal, aplanada en sentido antero-posterior, tiene dos ojos compuestos redondos que ocupan gran parte de la superficie de la cabeza, están separados por la frente y en la parte inferior por debajo de las inserciones antenales, por la sutura fronto-clipeal (MINSA, 2002c).

En la parte interna de la cabeza se observa el cibario o cibarium que es una estructura quitinosa que constituye la cavidad bucal, presenta dientes horizontales, laterales y verticales compuestos de quitina, cuya forma y número es propio y característico de cada especie. Las piezas bucales forman una probóscide corta para perforar y aspirar como aparato picador–chupador, por lo que no alcanza a picar los sitios cubiertos con ropa o pelo. En los machos, las mandíbulas están reducidas, imposibilitándoles la obtención de sangre. Al igual que otros insectos hematófagos poseen dos glándulas salivales saculares localizadas en el tórax, que vierten su secreción a través de conductos salivales que forman un canal a lo largo de la hipofaringe (Alvar, 2001; MINSA, 2002; Kato *et al.*, 2005).

Figura 8. Tracto alimentario de *Lutzomyia sp.*



(Fuente: Killick-Kendrick, 2002)

Las alas no presentan patrones de coloración y se disponen formando un ángulo de 45° respecto al eje corporal cuando el flebótomo está posado (en “V”), tienen forma lanceolada, las setas finas y largas que las revisten están implantadas sobre las nervaduras y a lo largo de los márgenes del ala. Las nervaduras sirven para la identificación taxonómica (MINSA, 2002c; Miró, 2007b).

El tórax se compone de tres segmentos fusionados protórax, mesotórax y metatórax. Los esternitos son las estructuras ventrales de carácter taxonómico que pueden tener diferentes formas. Cada uno de los tres segmentos da origen a un par de patas. Las patas son largas y delgadas, cada miembro se encuentra constituido por coxa, trocánter, fémur, tibia y tarso (MINSA, 2002c).

Las antenas son largas y están formadas por un total de 16 segmentos insertados uno a continuación de otro (antenómeros). Los palpos son largos y conformados por cinco segmentos que se encuentran cubiertos de setas pequeñas, la longitud relativa de cada segmento es útil para el reconocimiento de especies, el tercer segmento del palpo presenta un conjunto de estructuras sensoriales finas con forma de raqueta denominadas espinas sensoriales o escamas de Newstead (Alvar, 2001; MINSA, 2002c).

Figura 9. *Lutzomyia* spp.



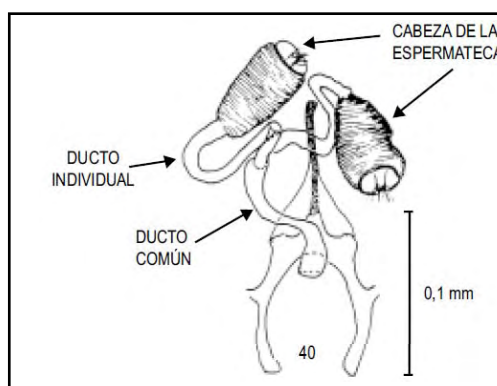
(Fuente: ENY-738S, 2007; OPS, 2007)

El abdomen es largo y está formado por 10 segmentos esclerosados. Los tres últimos segmentos sufren modificaciones para conformar los genitales externos. Los machos se diferencian de las hembras por presentar genitales externos grandes capaces de sujetar a la hembra durante el apareamiento (Barreto *et al.*, 1997; Alvar, 2001; Oshaghi *et al.*, 2008; Sobrado *et al.*, 2008).

La genitalia del macho está formada por: Un par de gonopodios divididos en gonocoxito y gonostilo. De la parte basal interna de los gonocoxitos, se observa el aedeago o pene y el par de parámetros que por su tamaño, forma y ornamentaciones son indispensables para la identificación de las especies. Un par de lóbulos laterales que son estructuras largas y cilíndricas que presentan diversas ornamentaciones en su parte media o terminal y cuya longitud y ancho varían según las especies. Y un par de cercos que son un par de lóbulos cortos que se observan cerca de la base de los lóbulos laterales (MINSA, 2002c).

La genitalia de la hembra está formada externamente por dos lóbulos laterales y dos cercos. Internamente mediante conductos individuales que desembocan en un par de espermatecas (saco o reservorio) se recibe y almacena la esperma de los machos. La forma de las espermatecas varía de manera impresionante según la especie que se trate, por lo que son de uso indispensable en taxonomía. La parte distal de la espermateca presenta la llamada cabeza y cuerpo (MINSA, 2002c).

Figura 10. Genitales de *Lutzomyia sp.*, hembra 10a) y macho 10b)



a)

(Fuente: MINSA, 2002c; Dantas, 2008)

b)

3.5. Hábitat

Los flebotomos tienen hábitats que varían desde los trópicos de selva húmeda a regiones muy áridas, con distribución desde el nivel del mar y los 3200 msnm (González y Zerpa, 2004).

3.6. Alimentación

Ambos sexos suelen alimentarse de sustancias azucaradas como la savia, pero mientras que los machos son exclusivamente fitófagos, las hembras además son hematófagas debido a que es imprescindible una nutrición proteica para la producción de huevos (Ramírez *et al.*, 2006; Miró, 2007b). Las hembras de *Lu. longipalpis* se alimentan de sangre de mamíferos y pájaros, además de aves domésticas como las gallinas (Milleron *et al.*, 2004; Lainson y Rangel, 2005).

El pH dentro del tracto digestivo ejerce una función fisiológica importante pues puede interferir en el desarrollo de *Leishmania* en los flebotomos infectados. Las hembras antes de alimentarse tienen un pH 5.5–6.0 en intestino medio torácico (IMT) y pH 6 en el intestino medio (IM), mientras que el pH del intestino medio abdominal (IMA) varía de 8.15 ± 0.31 en las primeras 10 horas post alimentación a 7.7 ± 0.17 después de las 24 horas. Por lo tanto, el IMA es alcalino durante la ingestión de sangre. Las hembras que no se han alimentado tienen una gran capacidad para mantener el pH casi constante y alrededor de 6 en el IM, aparentemente gracias a la anhidrasa carbónica. Después de la alimentación ocurre el fenómeno de alcalinización donde la volatilización del CO_2 contribuye en menor medida (Santos *et al.*, 2008).

3.7. Nombres comunes

Se les conoce con más de 50 nombres vulgares, de uso restringido a una región. En Perú se les conocen como “titira”, “plumilla”, “angelillos”, “puma”, “rapache”, “jenjen”, “manta blanca”, “capa blanca”, “lalapo”, “wanwa”, “pumamanchachi”, “pumakanikum”, “chuspi”, “quitis”, etc. (Cáceres y Galati, 2001; MINSA, 2002c). En Colombia “aliblanco”, “jején”, “manta”, “palomilla”, “pringador”, “capotillo”, etc. (Barreto *et al.*, 1997). En México “papalotilla”, en la República Dominicana “erizo”, en Panamá “chitra”, en Brasil “tatuquira”, en Venezuela “palomilla” entre otros (Medina, 2002).

3.8. Actividad circadiana

Tienen actividad crepuscular y nocturna (desde las 16:00 hasta las 07:00 horas del día siguiente), siempre que la temperatura sea superior a 18°C, no llueva y no haya viento. *Lu. peruensis* y *L. verrucarum* presentan un pico entre las 20 y 21 horas (MINSA, 2002c, Tejada *et al.*, 2003; González y Zerpa, 2004; Miró, 2007b). Probablemente el vector prefiere estas horas para alimentarse debido a que disminuye la temperatura y aumenta la humedad. Durante las horas de

inactividad se refugian en casas, bodegas, establos, agujeros de las paredes, basureros, madrigueras o nidos de los mamíferos reservorio, vegetación, etc. (Killick-Kendrick, 1999).

3.9. Feromonas

Las glándulas debajo de la superficie de la cutícula producen feromonas que tienen influencia en el comportamiento sexual de *Lu. longipalpis*. Cuatro feromonas sexuales han sido identificadas en Brasil: (S)-9-methyl-germacrene-B (9MGB), 3-methyl- α -himachalene (3MAH), α -himachalene (AH) y cembrene diterpene (CEMB) (Watts *et al.*, 2005).

3.10. Métodos de captura

La captura de los especímenes se realiza con trampas de acuerdo a la necesidad del estudio (MINSA, 2002c):

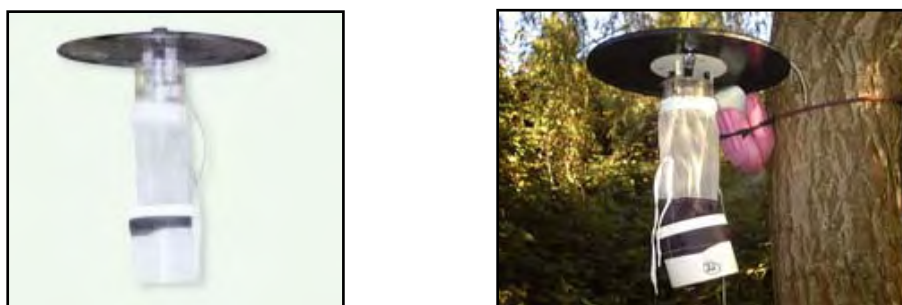
a) Capturador manual o eléctrico con tubo aspirador de Castro

El aspirador consta de una parte rígida de vidrio o de mica de 30 a 40 cm de largo por 1 cm de diámetro y una parte flexible de tubo de látex de 60 cm de longitud; entre estas partes se encuentra el filtro (organza). Permite capturar especímenes antropofílicos vivos y puede utilizarse en lugares de reposo (MINSA, 2002c).

b) Trampas miniatura CDC con atrayente luminoso

Está formada por un tubo plástico transparente, con un ventilador en la parte central interna y un foco. En el otro extremo se adhiere un envase a manera de manga. La energía para el funcionamiento es de 6 voltios por lo que el motor debe ser de 3500 rpm y de 150 miliamperios de intensidad. Permite capturar especímenes vivos de ambos sexos, atraídos por la luz al aspirarlos hasta que lleguen al contenedor plástico que puede ser cambiado de acuerdo a la necesidad de obtener el material vivo para lograr el aislamiento del agente (Herrer, 1999; MINSA, 2002c).

Figura 11. Trampa miniatura tipo CDC



(Fuente: MINSA, 2002c; Nuñez, 2007)

c) Trampa Shannon

Fue diseñada por Shannon en 1939 y consiste en una carpa rectangular de tela de tocuyo sin base y colgante. La trampa es suspendida a 25 cm del suelo mediante cuerdas que son atadas a palos o ramas de los árboles. Usada para la captura de especímenes vivos de ambos sexos. Según el atractivo colocado dentro de la trampa, se pueden coleccionar especímenes antropofílicos, zoofílicos y atraídos por la luz. Aplicable para la captura de vectores y para obtener especímenes para una colonia (Herrer, 1999; MINSA, 2002c).

d) Capturas con trampas pegajosas

Es una trampa de vuelo donde el insecto queda atrapado en papel cubierto de aceite de castor o resina. Se colocan en lugares donde descansan animales silvestres o domésticos. Puede ser dejada 2 días como máximo, los insectos adheridos al papel se retiran aplicando gotas de detergente sobre el espécimen, se deja que emulsione por unos segundos, se recojen con pinzas de punta fina y se colocan en viales conteniendo alcohol al 70%. No se pueden emplear fuera de las viviendas en épocas de lluvia. El objetivo es capturar especímenes que no son atraídos por los cebos convencionales y es aplicable para estudios de entomofauna y epidemiológicos (MINSA, 2002c).

3.11. Métodos de conservación

Una vez capturadas deben ser transportadas al laboratorio para ser procesadas y sometidas a estudios taxonómicos definitivos. Son transferidas a vasos colectores y mantenidas en ambientes con humedad relativa entre 80 - 85% (Herrer, 1999; MINSA, 2002c). La tasa de supervivencia se prolongará si son mantenidas en cajas térmicas entre 15°C y 20°C. También pueden depositarse en crioviales de 2 ml y ser colocadas en nitrógeno líquido. Si no han sido congeladas se les sacrifica mediante la exposición a los vapores de tetracloruro de carbono, de cianuro de potasio, acetato de etilo, cloroformo, éter, a -21°C o al calor. Pueden ser almacenadas en etanol al 96% y a -20° C (Barreto *et al.*, 1997; MINSA, 2002c; MINSA, 2005b; Oshaghi *et al.*, 2008; Sobrado *et al.*, 2008).

3.12. Disección e identificación

Los ejemplares de las *Lutzomyia* se colocan en alcohol al 70% para liberarlos de escamas o grasas. Luego se realiza el proceso de maceración al colocarlos en una solución de hidróxido de sodio al 10% en donde permanecen 1 ó 2 días tomando tonos claros. Para detener este proceso, lavar la muestra colocando los especímenes en un recipiente con agua durante 5 minutos y luego en lacto-fenol o fenol por un espacio mínimo de 30 minutos. Los especímenes pueden colorearse

con fucsina básica por espacio de 5 minutos (la solución de coloración se prepara mezclando 30 mg/L de fenol en alcohol absoluto) (MINSA, 2002c).

Para la disección se emplea estereomicroscopio con platina refrigerada, se colocan los ejemplares individualmente sobre portaobjetos y se utilizan micro agujas estériles (25g x 16mm). Se les retiran las alas, patas, antenas, palpos y se adicionan 2 gotas de solución salina con antibiótico. Los machos son identificados por los genitales, mientras que las hembras pueden separarse sólo por la morfología de las espermatecas, se examina las armaduras bucales en el cibario y/o faringe. Sin embargo algunas especies son aparentemente indistinguibles siendo necesario realizar análisis de las isoenzimas o PCR. Si es necesario se obtiene el intestino y se observa al microscopio utilizando objetivos de 10X o de 40X para observar la presencia de flagelados compatibles a *Leishmania*, esta muestra se puede cultivar o congelar para ser procesado por PCR (Barreto *et al.*, 1997; Alvar, 2001; MINSA, 2005b; Oshaghi *et al.*, 2008; Sobrado *et al.*, 2008).

3.13. Métodos de colonización en el laboratorio

Estos ejemplares se emplean para realizar estudios como: taxonomía, infecciones experimentales, pruebas de xenodiagnóstico, etc. Se necesita un ambiente de 6 m². Luego de capturarse con sumo cuidado (con aspirador manual o con trampa Shannon) deben ser colocadas en vasos de crianza especiales, son alimentadas con animales de laboratorio (hámsteres, cuyes, ratones) previamente anestesiados con 0,4 mL de xilocaína al 2% vía peritoneal. En cada vaso de crianza, se colocarán de 6 a 8 *Lutzomyia*, las que deberán observarse durante 14 días. Colocar en la tapa del vaso de crianza sustancia azucarada embebida en algodón que le servirán de alimento. Si algún ejemplar muere, debe ser retirado cuanto antes (MINSA, 2002c).

Figura 12. Vaso de crianza



(Fuente: MINSA, 2002c)

Una vez que las *Lutzomyia* hembras depositen sus huevos deben ser retiradas para ser identificadas. Luego de la eclosión de los huevos las larvas emergen, en este momento se debe colocar el alimento, dejándolo caer en el vaso de crianza en pequeñas cantidades (mezcla de alimento balanceado para conejos, con heces de conejo en proporción de 1 a 1; previamente fermentada, secada, molida, cernida y luego esterilizada). Transcurrido el período de los cuatro

estadios larvales se debe retirar los restos de alimento, para que la pupa pueda fijarse y porque esta necesita poca o casi nada de humedad ambiental. Cuando se transformen en adultos colocar nuevamente en las tapas de los vasos las sustancias azucaradas embebidas en algodón (MINSA, 2002c).

3.14. Especies

En el Nuevo Mundo existen más de 350 especies de flebótomos, de las cuales 88 son vectores potenciales por picar a las personas. De ellos los flebótomos incriminados como vectores son (OPS, 1996):

Subgénero *Lutzomyia*

- *Lu. cruciata* vector potencial en Estados Unidos (Duprey *et al.*, 2006).
- *Lu. diabolica* vector potencial en Estados Unidos (Duprey *et al.*, 2006).
- *Lu. gomezi* vector de *L. panamensis* en Panamá y en Colombia, vector de *L. braziliensis* (Ramírez *et al.*, 2006).
- *Lu. longipalpis* principal vector de leishmaniasis visceral en varios países de América, es vector de *L. chagasi* (Ramírez *et al.*, 2006; Dantas, 2008). Se distribuye desde el sur de México hasta el norte de Argentina y es capturada dentro y fuera de las viviendas humanas (Milleron *et al.*, 2004; Lainson y Rangel, 2005; González *et al.*, 2006; Diniz *et al.*, 2008).
- *Lu. ayacuchensis* es vector *L. peruviana* y de *L. mexicana* en Ecuador, se encuentra entre los 1400 y 2950 msnm. Es una especie muy antropofílica, además se alimenta de sangre de animales domésticos y silvestres (Cáceres y Galati, 2001; Kato *et al.*, 2005).
- *Lu. hartmanni* es vector de *L. colombiensis* (Barreto *et al.*, 1997).
- *Lu. peruensis* ocurre exclusivamente en el Perú y está presente en los valles occidentales del norte y centro, así como en ciertas provincias de los valles interandinos, es vector de *L. peruviana*. Con frecuencia se capturan sobre los 1600 msnm y, en menor cantidad, por encima de los 3100 msnm (Cáceres y Galati, 2001; MINSA, 2002c).
- *Lu. pescei* se le incrimina como vector potencial en la leishmaniosis cutánea andina en las provincias de Andahuaylas, Churcampá, Tayacaja (Huancavelica), en Huancayo (Junín) y en Calca (Cusco). Especie propia del Perú. Se le encuentra con frecuencia en localidades ubicadas entre los 2200 y 3300 msnm (Cáceres y Galati, 2001; MINSA, 2002c).
- *Lu. tejadai* vector de *L. Viannia* en la provincia de Huánuco (Ambo, Pachitea, Huamalíes y Huánuco) y Daniel A. Carrión (Pasco). Es una especie antropofílica y zoofílica (Cáceres y Galati, 2001).

Subgénero *Nyssomyia*

- *Lu. anduzei* vector de *L. guyanensis* (Niederwieser, 2004).
- *Lu. trapidoi* vector de *L. panamensis* en Ecuador (Bañuls *et al.*, 1999), en Panamá, Colombia (Ramírez *et al.*, 2006). Se distribuye en América central y América del sur (Niederwieser, 2004).
- *Lu. umbratilis* es vector de *L. braziliensis* y de *L. guyanensis* (Niederwieser, 2004; Ramírez *et al.*, 2006).
- *Lu. whitmani* es vector de *L. amazonensis* y *L. braziliensis* (Barreto *et al.*, 1997, 2006).
- *Lu. shawi* (Cáceres y Galati, 2001).

Subgénero *Psychodopygus*

- *Lu. panamensis* es vector de *L. braziliensis* en Guatemala y de *L. panamensis* en Panamá (OPS, 1996).
- *Lu. wellcomei* vector de *L. braziliensis* (Niederwieser, 2004).
- *Lu. carrerai* es vector de *L. braziliensis* (Niederwieser, 2004).

Subgénero *Pintomyia*

- *L. chagasi* de mayor importancia en algunas áreas de Colombia y Venezuela, está presente en varios países de Latinoamérica incluidas México, Guatemala, El Salvador, Honduras, Nicaragua y Costa Rica, pero no ha sido detectada en Brasil (OPS, 1996; González *et al.*, 2006; Ramírez *et al.*, 2006; Diniz *et al.*, 2008).
- *Lu. verrucarum* es una especie propia del Perú presente en los valles occidentales del norte y centro del Perú, desde Ayabaca (Piura) hasta Huaytará (Huancavelica), encontrándose en altitudes comprendidas entre 1100 y 2980 msnm. En los valles interandinos del centro y sur, están presentes desde los 1200 hasta los 3200 msnm. También es capaz de transmitir la bacteria *Bartonella bacilliformis* vector principal de la bartonelosis, verruga peruana o enfermedad de Carrión y ha originado brotes epidémicos con mortalidad muy alta en Perú, Ecuador y Colombia (MINSA, 2002c; Barreto *et al.*, 2006).

Subgénero *Psathyromyia*

- *Lu. shannoni* es vector potencial en Estados Unidos (Duprey *et al.*, 2006).

Subgénero *Micropygomyia*

- *Lu. cayennensis cayennensis* es antropofílico (Cochemo *et al.*, 2007).

Subgénero *Bichromomyia*

- *Lu. flaviscutellata* es vector de *L. amazonensis* (Niederwieser, 2004).
- *Lu. intermedia* vector de *L. amazonensis* y *L. braziliensis* (Barreto *et al.*, 2006).
- *Lu. olmeca bicolor* vector de *L. mexicana* (Ramírez *et al.*, 2006).
- *Lu. olmeca olmeca* es vector de *L. mexicana* (OPS, 1996).
- *Lu. reducta* (Cáceres y Galati, 2001).

Subgénero *Migonemyia*

- *Lu. migonei* pueden infectarse naturalmente con *Leishmania* en Argentina (Rosa, 2001).

Grupo de especies (informal)

- *Lu. youngi* es un posible vector de leishmaniasis en Costa Rica y Venezuela (Barreto *et al.*, 2006).
- *Lu. spinicrassa* vector de *L. braziliensis* (Ramírez *et al.*, 2006).

Además:

- *Lu. columbiana* es antropofílica (Barreto *et al.*, 2006).
- *Lu. neivai* es vector de *L. Viannia* en Argentina (Salomon *et al.*, 2002).
- *Lu. townsendi* es antropofílica (Barreto *et al.*, 2006).
- *Lu. anthrophora* es vector potencial en Estados Unidos (Duprey *et al.*, 2006).

4. Signos clínicos en caninos

La leishmaniasis canina (Lcan) es una enfermedad crónica víscero-cutánea, es decir ambas manifestaciones se encuentran simultáneamente en perros. Debido a que en esta especie la piel se ve afectada en el transcurso de la diseminación de la enfermedad a los órganos internos (Killick-Kendrick, 1999; Baneth, 2006; Miró, 2007b; OIE, 2008).

Los signos clínicos se pueden clasificar en:

- Por su curso: agudo, subagudo, crónico (Miró, 2007b).
- Según la intensidad: polisintomáticas, oligosintomáticas y asintomáticas. Más del 50% de los perros infectados son asintomáticos (CFSPH, 2004; Miró, 2007b; Romero *et al.*, 2008).

4.1. Signos de lesión cutánea

En el perro la piel se ve afectada en el transcurso de la diseminación de la enfermedad a los órganos internos mientras que en los seres humanos la picadura del flebótomo provoca una inflamación localizada con posterior ulceración de la zona (Alvar, 2001; Miró, 2007b).

4.1.1. Formas localizadas

En perros los lugares de más fácil acceso para la picadura del vector son los desprovistos de pelo, como: la trufa, los párpados, cara interna de pabellones auriculares, abdomen, región perianal, etc., donde la aparición del foco inflamatorio es mínima y puede pasar desapercibida. La lesión cutánea que aparece en el punto de la picadura del vector se caracteriza por ser asimétrica y aprurítica, aparece a los 20 días de la infección y suele ser una lesión eritemo-escamosa, ulcerocostrosa ó cicatricial (Alvar, 2001; Miró, 2007b).

Figura 13. Lesión cutánea en el punto de la picadura del vector



(Fuente: Ferrer, 1999)

4.1.2. Formas generalizadas

Su presentación coincide con la diseminación orgánica del parásito. Podemos observar tres patrones bien diferenciados con algunas características comunes como: simetría, cronicidad de las lesiones, ausencia de prurito o prurito leve y pobre o nula respuesta a antibioterapia y corticoides (Alvar, 2001; Miró, 2007b).

a) Forma querato-seborreica

Lesiones caracterizadas por áreas de alopecia focal, multifocal o generalizada, cuando es periorbital da aspecto de antifaz (Travi, 2000; Zárate *et al.*, 2007). La descamación epidérmica abundante y de color blanquecino da a la piel un aspecto seco, inicialmente suelen aparecer en la cara (hiperqueratosis nasal, en borde de orejas, región periorbitaria) y extremidades (hiperqueratosis digital), extendiéndose progresivamente al resto del cuerpo. Son frecuentes las piodermas superficiales secundarias (Vásquez, 2006; Adamama *et al.*, 2007; Miró, 2007b).

Figura 14. Alopecia e Hiperqueratosis en cabeza (1a) y generalizada (1b)



a) b)
(Fuente: Ferrer, 1999)

b) Forma nodular

Se localiza en zonas exentas de pelo, miden de 1-3 cm, generalmente no ulcerados sin dolor ni prurito la mayoría desaparece en 1-6 meses. Son de presentación más frecuente en razas de pelo corto como Bóxer, Rottweiler, Doberman, etc. se trata de nódulos de carácter granulomatosos a partir de los cuales podemos observar amastigotes (Ferrer, 1999; Adamama *et al.*, 2007; Castagnaro *et al.*, 2007; Dantas, 2008).

Figura 15. Lesiones nodulares en oreja de canino



(Miró, 2008)

c) Forma ulcerativa

Se caracteriza por la presencia de úlceras crónicas en la piel de orejas, nariz, espacios interdigitales, almohadillas plantares, escroto, vientre, cola, puntos de apoyo (carpo, tuberosidad coxal e isquiática), en mucosas oral y genital (Vásquez, 2006; Adamama *et al.*, 2007; Miró, 2007b; dos Santos *et al.*, 2008).

Figura 16. Úlceras en piel de orejas de canino



(Travi *et al.*, 2006)

d) Otras formas cutáneas

Despigmentación con diámetro >0.5 cm en cualquier parte del cuerpo (Herrer, 1999; Medina, 2002; Miró, 2007b). Perionixis y onicogriphosis, el crecimiento de uñas supera el desgaste natural (Travi, 2000; Adamama *et al.*, 2007; Romero *et al.*, 2008).

Figura 17. Caninos con Onicogriphosis



(Fuente: Noli, 1999; Leishmune®, 2009)

4.2. Signos clínicos inespecíficos

- Adelgazamiento, astenia, apatía, e inapetencia, se puede alcanzar el estado caquéctico en procesos avanzados (Schallig *et al.*, 2004; Miró, 2007b).
- Atrofia muscular, fácil de observar en músculos temporal y maseteros (Schallig *et al.*, 2004; Miró, 2007b).
- Palidez de membranas mucosas, epistaxis (Schallig *et al.*, 2004; Miró, 2007b).
- Fiebre (puede ser intermitente) 39–40°C o mantenerse constante (Ferrer, 1999; Schallig *et al.*, 2004; Miró, 2007b).
- Linfadenomegalia localizada o generalizada, signo más frecuentemente observado en perros afectados (Miró, 2007b; Costa, 2008).
- Esplenomegalia (Vásquez, 2006; Miró, 2007b).

Figura 18. Epistaxis 18a) y Caquexia 18b)



a)

b)

(Fuente: Ferrer, 1999; Noli, 1999)

4.3. Signos clínicos específicos

- Las alteraciones renales llevan a poliuria y polidipsia. Este cuadro clínico, de mal pronóstico, suele ser la causa más frecuente de muerte en los perros afectados (OPS, 1996; Miró, 2007b; Roura, 2008).
- Las alteraciones hepáticas producen vómitos, adelgazamiento, poliuria, polidipsia, ascitis, etc. (Schallig *et al.*, 2004; Adamama *et al.*, 2007; Miró, 2007b).
- Las alteraciones digestivas son mucho menos frecuentes, manifestadas por diarreas con o sin melena (Schallig *et al.*, 2004; Adamama *et al.*, 2007; Miró, 2007b).
- Poliartritis, se manifiesta por cojeras a menudo de curso intermitente, si se cronifican y especialmente en razas de gran tamaño pueden contribuir a problemas de ligamentos, como ruptura de ligamentos cruzados (Duprey *et al.*, 2006; Miró, 2007b).
- Las lesiones oculares pueden ser bilaterales o unilaterales, en una minoría de animales podría ser la única o la principal manifestación clínica (Komnenou y Koutinas, 2007). Las más frecuentes son lesiones del segmento anterior como: blefaritis, conjuntivitis, uveítis y queratitis o sus asociaciones, siendo frecuente la queratoconjuntivitis seca caracterizada clínicamente por hiperemia, descarga purulenta, edema de cornea y uveovascularización (OPS, 1996; Castagnaro *et al.*, 2007; Komnenou y Koutinas, 2007; Miró, 2007b; Zárate *et al.*, 2007).
A nivel del segmento posterior, menos frecuentes, pueden presentarse hemorragias de retina que pueden llevar a derrame retinal, glaucoma secundario y panoftalmitis con pérdida permanente de la visión (Castagnaro *et al.*, 2007; Komnenou y Koutinas, 2007; Miró, 2007b).

Figura 19. Queratoconjuntivitis seca y blefaritis



(Fuente: Bowman, 2007)

5. Transmisión

- Transmisión natural se produce por la picadura del insecto vector *Lutzomya* (OIE, 2008).
- Transmisión venérea, es incriminada porque se puede observar la presencia de *Leishmania* en el semen de perros infectados. En estos animales se observó lesiones genitales como epididimitis y balanopostitis, con abundantes amastigotes en ellas. Esta forma de transmisión podría tener un impacto significativo en las poblaciones urbanas densas, particularmente en Brasil (Diniz *et al.*, 2005, 2008).
- Transmisión vertical, podría explicar el mecanismo de transmisión entre foxhounds y el porqué esta infección es limitada a esta raza, durante el brote de leishmaniosis que se inició en 1980 en Estados Unidos. Es posible como consecuencia de la transmisión durante la preñez o durante la labor de parto, siempre y cuando el paciente nunca haya estado en un área endémica (Lindsay y Zajac, 2002; Boehme, 2006; Duprey *et al.*, 2006; Miró, 2007b; Diniz *et al.*, 2008).
- Transmisión horizontal, sin la presencia del insecto hematófago es sospechada en algunas áreas donde los vectores de la enfermedad están aparentemente ausentes, debido a que son comunes las laceraciones que ayudan a un potencial intercambio de fluidos corporales (Duprey *et al.*, 2006; Baneth, 2007).
- Transfusión de sangre, se reportó el 2001 donde se pudo comprobar que la transmisión tuvo su origen en la transfusión de sangre infectada procedente de un banco de sangre animal de donantes clínicamente sanos (Owens *et al.*, 2001; Wardrop *et al.*, 2005; Miró, 2007b).

6. Factores de riesgo

- **Sexo:** No es un factor determinante (Diniz *et al.*, 2008).
- **Edad:** Es una enfermedad que se da a cualquier edad aunque las características del vector y los períodos de incubación en el perro (entre 3 meses y 7 años) hacen que sea poco frecuente en animales menores de 6 meses de edad (Roura, 2007; Diniz *et al.*, 2008).

- **Raza:** Todas las razas de perros son susceptibles. En zonas no endémicas de leishmaniosis se ha descrito una predisposición en la raza foxhound americana. Algunas razas autóctonas de regiones endémicas como los podencos ibicencos poseen una resistencia genética a la infección al ser capaces de generar una respuesta celular Th1 en el 81% de los casos. Los tamaños toy son menos afectados por tener una vida en el interior de las viviendas y las razas de pelo largo están menos predispuestas a la picadura del flebótomo (Noli, 1999; Sánchez *et al.*, 2005; Duprey *et al.*, 2006; Baneth, 2007; Miró, 2007b; Diniz *et al.*, 2008).
- **Actividad:** El riesgo depende de las actividades del perro (los perros salvajes, campestres y los que trabajan tienen un riesgo más elevado de picaduras del insecto que los que viven en la ciudad) (Milteforan®, 2007).

7. Reservorios

Los reservorios de *Leishmania* son animales domésticos y silvestres. Dentro de los animales domésticos el perro es un excelente reservorio por tres principales razones:

- El periodo pre patente es muy variable en cada perro: Puede ser desde 3 meses hasta varios años (Baneth, 2007).
- La alta concentración de amastigotes en la piel: Tanto los perros sintomáticos como los asintomáticos pueden infectar a los flebótomos (Todolí *et al.*, 2007).
- Alto porcentaje de recaídas después del tratamiento: La vida media de un perro con leishmaniasis puede ser de dos a tres años (Reithinger y Davies, 1999).

Se pueden distinguir tres clases de reservorios: primarios, secundarios e incidentales:

7.1. Reservorio primario

Se denomina así al animal que es el refugio habitual del parásito y mantiene la enfermedad en su entorno como reservorio estable, por lo que tienen el papel más importante en la perpetuación de la enfermedad. En América los perros y los cánidos silvestres como el zorro cangrejero (*Cerdocyon thous*) y chacales son el reservorio primario de la LV, también se ha identificado *L. chagasi* en *Didelphis marsupialis*. El zorro es considerado el eslabón entre el ciclo selvático y doméstico (Palatnik *et al.*, 2001; Miró, 2007b; Diniz *et al.*, 2008).

Mientras que los reservorios primarios de la LC varían según la localización, pueden ser roedores silvestres, hiráceos (pequeños mamíferos del orden *Hyracoidea*), los desdentados (perezosos), marsupiales y perros (Baneth y Jaffe, 1999; OPS, 2005; Diniz *et al.*, 2008). En roedores se observan alteraciones de la piel, sobre todo en la base de la cola y en ocasiones, en las orejas y dedos, entre ellos se encuentran en la península de Yucatán a *Ototylomys phyllotis*,

Heteromys sp., *Nyctomys sp.*, y *Sigmodon sp.* En Brasil la rata semiespinosa *Proechimys sp.* (Alvar, 2001; Acha y Szyfres, 2003).

En el continente americano el hombre no es reservorio demostrado de la enfermedad, aunque se sospecha de él por que no se conoce los reservorios silvestres de *L. peruviana*, donde únicamente el perro es el único hospedero no humano, y porque la presencia de miembros de la familia con leishmaniasis resultaron ser un factor de riesgo para los niños menores de 5 años en un estudio realizado en Brasil (Acha y Szyfres, 2003; Ampuero *et al.*, 2005; Misionesalud, 2005).

7.2. Reservorio secundario

Es el animal que ocupa el segundo lugar en importancia en el mantenimiento de la epidemiología de la enfermedad, por ser poco abundantes o porque su tasa de infección es baja y generalmente inaparentes. Un gran número de especies de mamíferos silvestres están infectadas, entre ellas la rata doméstica (*Rattus rattus*), la zarigüeya (*Didelphis marsupialis*), los zorros (*Cercopithecus thous*, *Lycalopex vetulus*), los lobos (*Canis lupus*), los chacales (*Canis aureus*), el oso perezoso (*Choloepus didactylus*), el oso de dos dedos (*Choloepus hoffmanni*) y el oso hormiguero (*Tamandua tetradactyla*) (Acha y Szyfres, 2003; Lainson y Rangel, 2005; Ramírez *et al.*, 2006).

7.3. Reservorio incidental (Hospederos paraténicos)

Tienen escasa relevancia en el mantenimiento o transmisión de la enfermedad. Entre ellos se encuentran: los primates, équidos, lagartijas, gatos y gallinas (Herrer, 1999; CFSPH, 2004; Miró, 2007b; Diniz *et al.*, 2008).

8. Reportes de especies de *Leishmania spp.*

Al menos 16 especies y subespecies son patógenas para mamíferos (OIE, 2008).

Tabla 1. Especies de *Leishmania spp.*

SUBGÉNERO	COMPLEJO	SUBESPECIE	DISTRIBUCIÓN GEOGRÁFICA	VECTOR PRINCIPAL	RESERVORIO PRINCIPAL
Viannia	<i>L. braziliensis</i>	<i>braziliensis</i>	Brasil, Colombia, oriente de Bolivia, Paraguay, Perú, Venezuela, Ecuador	<i>Lu. wellcomei</i>	Roedores y perros
		<i>peruviana</i>	Valles andinos de Perú, Surinam, Guyana	<i>Lu. peruensis</i> <i>Lu. verrucarum</i>	Perro
	<i>L. guyanensis</i>	<i>guyanensis</i>	Norte de amazonas de Brasil, Guayana Francesa, Guyana y Surinam	<i>Lu. umbratis</i>	Perezoso y hormiguero
		<i>panamensis</i>	Panamá, Costa Rica, Colombia, Honduras	<i>Lu. trapidoi</i>	Perezoso
Leishmania	<i>L. donovani</i>	<i>donovani</i>	India, China, Bangladesh	<i>P. argentipes</i>	Hombre, perro y roedores
		<i>archibaldi</i>	Sudán, Etiopía		
	<i>L. infantum</i>	<i>infantum-chagasi</i>	América central y sur. Asia, China, Oriente Medio, África	<i>Lu. longipalpis</i> <i>P. perniciosus</i>	Cánidos
		<i>tropica</i>	Asia, Oriente Medio		Hombre y perros
		<i>killicki</i>	Túnez		
	<i>L. major</i>	<i>major</i>	África, Oriente medio, Asia	<i>P. major</i>	Jerbo
	<i>L. arabica</i>	<i>arabica</i>	Arabia Saudí		
	<i>L. aethiopica</i>	<i>aethiopica</i>	Etiopía, Kenya		Hiráceos
	<i>L. gerbilli</i>	<i>gerbilli</i>	China, Mongolia		
	<i>L. mexicana</i>	<i>mexicana</i>	México, Belice, Guatemala, sur de Estados Unidos, Brasil, Venezuela	<i>Lu. olmeca</i>	
		<i>amazonensis</i>	Brasil (amazonía)	<i>Lu. flaviscutellata</i>	
		<i>venezuelensis</i>	Venezuela	<i>Lu. olmeca</i>	Desconocido
		<i>pifanoi</i>	Venezuela		

(Fuente: OPS, 1996; Pereira, 2002; Castro, *et al.*, 2003; Gonzáles y Zerpa, 2004; Ramírez *et al.*, 2006; Orué *et al.*, 2008)

Los agentes patógenos en el continente americano incluyen a todas las especies del subgénero *Viannia* y algunas del subgénero *Leishmania*. En el perro se ha identificado a *Leishmania panamensis*, *L. braziliensis*, *L. peruviana* y *L. chagasi* (Roberts, 2006; Vásquez, 2006).

L. infantum y *L. chagasi*, son conocidas por ser genéticamente idénticas lo que demuestra que son de la misma especie (OIE, 2008). Sin embargo, Lainson y Shaw basados en trabajos de análisis de DNAk, anticuerpos monoclonales generados contra la superficie de promastigotes y de acuerdo con la International Commission on Zoological Nomenclature 1999, concluyen que al existir muchas interrogantes en relación al origen, identidad y epidemiología de los vectores de LV Americana, es correcto y más prudente usar el nombre *L. (L.) infantum chagasi* y *L. (L.) infantum infantum* (Lainson y Rangel, 2005; Shaw, 2006).

La Lcan está más ampliamente distribuida que la leishmaniasis humana visceral, y no está invariablemente asociada con la presencia de casos humanos (Killick-Kendrick R, 1999). Sin embargo los brotes en perros pueden preceder a los brotes en humanos, como lo ocurrido en Belo Horizonte en el periodo 1993-1997. En donde el perro podría servir de hospedero centinela para la evaluación del riesgo de leishmaniasis en poblaciones humanas susceptibles de contraer la enfermedad (Gradoni, 2002; Misionesalud, 2005; Diniz *et al.*, 2008). Cualquiera sea la especie que causa la infección, los perros presentan con frecuencia tanto manifestaciones cutáneas como viscerales (Acha y Szyfres, 2003).

8.1. América del norte

Canadá

Dos provincias canadienses reportaron *L. infantum* en foxhounds (Lindsay y Zajac, 2002; Duprey *et al.*, 2006).

Estados Unidos

El primer reporte fue en una hembra foxhounds de 7 años en Edmond, cerca a Oklahoma en 1980. Exámenes posteriores revelaron a varios cientos de perros infectados en 69 clubes de perros de caza en 21 estados. Casos humanos de LV originados en este país no fueron reportados. El agente causal fue *L. infantum*, el zimodemo identificado fue MON1, que es más comúnmente aislado de animales y humanos en la cuenca mediterránea, esto sugiere su procedencia (Lindsay y Zajac, 2002; Baneth, 2006; Bowman, 2007; Zárate *et al.*, 2007).

Solo se conocen cuatro especies de flebótomos del género *Lutzomyia* que están presentes en el país: *Lu. anthrophora* y *Lu. diabolica* se encuentran en Texas, *Lu. cruciata* en Florida y Georgia y *Lu. shannoni* que ha sido identificada en Alabama, Arkansas, Delaware, Florida, Georgia, Louisiana, Mississippi, Carolina del Norte, Carolina del sur y New Jersey. El rango de *Lu. shannoni* sobrepasa la localización de muchos clubes de caza donde se encontraron perros infectados. Estudios experimentales mostraron que *Lu. shannoni* puede infectarse con *L. infantum* después de alimentarse con perros infectados (Lindsay y Zajac, 2002; Duprey *et al.*, 2006).

Si *Leishmania* se adapta al vector originario de estas zonas, la probabilidad de un contagio a humanos es enorme (ENY-738S, 2007).

México

Lu. longipalpis habita en en el país. *L. mexicana* ha sido identificada y los roedores *Heteromys*, *Nyctomys*, *Ototylomy* y *Sigmodon* son presuntos reservorios. En los perros se ha detectado la presencia de amastigotes en lesiones cutáneas. El vector comprobado es *Lu. olmeca olmeca* y *Lu. diabolica* es el vector sospechoso. En 1989 se notificó *L. braziliensis* (OPS, 1996).

8.2. América del centro

Guatemala

Existe *Lu. longipalpis*. Se ha identificado a *L. mexicana*, *L. braziliensis* y *L. panamensis*. El vector posible de *L. mexicana* es *Lu. olmeca olmeca* (OPS, 1996).

Bélice

Está presente *L. mexicana*, cuyo vector es *Lu. olmeca olmeca*, la que ha sido identificada en diferentes roedores como hospederos reservorios (*Heteromys*, *Nyctomys*, *Ototylomys* y *Sigmodon*). Así mismo en 1984 también se identificó *L. braziliensis* (OPS, 1996).

Honduras

En Honduras se identificó *L. chagasi*, *L. panamensis* y *L. braziliensis*. Además se identificaron 39 especies de flebótomos entre las que se encuentran *Lu. longipalpis*, *Lu. trapidoi*, *Lu. panamensis* y *Lu. olmeca olmeca* (OPS, 1996). Y las regiones del sur como Choluteca y El Paraíso son las más afectadas (Killick-Kendrick, 1999).

El Salvador

También se ha identificado a *L. chagasi*. En 1960 se demostró la existencia de ocho especies de flebótomos, siendo la predominante *Lu. longipalpis*, otras especies fueron *Lu. evansi*, *Lu. cayennensis*, *Lu. cruciata* y *Lu. gomezi*. La leishmaniasis es una enfermedad de notificación obligatoria (OPS, 1996). Y la región endémica en este país está ubicada al este, en la frontera con Honduras (Killick-Kendrick, 1999).

Nicaragua

Se ha reportado por los años 90 a *L. chagasi*, *L. braziliensis* y al híbrido *L. braziliensis/panamensis* (OPS, 1996). Al igual que *Lu. trapidoi* y *Lu. ylephiletor*. La enfermedad es reportada en el noreste hacia la frontera con Honduras (Killick-Kendrick, 1999).

Costa Rica

En este país se encuentra presente *Lu. longipalpis* como vector de *L. chagasi*. Además de *L. panamensis* y *L. braziliensis*. Esporádicamente se han hallado perros domésticos infectados. La LC es una enfermedad de notificación obligatoria (OPS, 1996).

Panamá

Coexisten las especies *L. panamensis*, *L. colombiensis*, *L. amazonensis*, *L. mexicana*, *L. chagasi* y *L. braziliensis*. Los vectores presentes son *Lu. longipalpis*, *Lu. trapidoi*, *Lu. ylephiletor*, *Lu. gomezi*, *Lu. panamensis* y *Lu. hartmani*. En este país la leishmaniasis es una enfermedad de notificación obligatoria (OPS, 1996).

Cuba

En Cuba no se ha comunicado la presencia de *Leishmania* en seres humanos, reservorios naturales o flebótomos, sin embargo en todo el país está presente *Lu. orestes*, que por picar al hombre ávidamente podría ser un vector potencial (OPS, 1996).

Jamaica

En Jamaica no se han notificado casos de leishmaniasis; sin embargo, está presente *Lu. duppuyorum*, que en circunstancias particulares podría ser un vector (OPS, 1996).

Haití

Está presente *Lu. christophei* y *Lu. cayennensis*, la leishmaniasis puede estar presente, aunque con una incidencia muy baja, por lo que aun no ha sido notificada. La leishmaniasis es una enfermedad de notificación obligatoria (OPS, 1996).

República Dominicana

Los parásitos existentes pertenecen al subgénero *Leishmania*. Se conocen dos especies de flebótomos *Lu. christophei* y *Lu. cayennensis hispaniola*, de éstas la única antropofílica es la primera. No se ha encontrado infección en animales (OPS, 1996).

8.3. América del sur

Colombia

El primer reporte de infección en caninos se realizó en 1969. Donde se identificó a *L. chagasi*, *L. colombiensis*, *L. braziliensis*, *L. mexicana*, *L. amazonensis*, *L. panamensis* y *L. guyanensis*. Reportando Lcan en el departamento de Meta, Villavicencio; en Calima y Nariño (Killick-Kendrick R, 1999; Travi *et al.*, Vásquez, 2006). Además se han reportado 129 especies de *Lutzomyia* de las cuales las Barreto *et al.*, identificaron a 33 especies, de las cuales *Lu. evansi* y *Lu. gomezi* son las especies principales incriminadas como vectores (Barreto *et al.*, 2006; Cortéz, 2006).

Durante el periodo de 1985 a 1996, se informó de 55 888 casos de leishmaniasis humana, entre los que predominaba la forma cutánea (95%). En el departamento de Chocó la enfermedad se conoce como “bejuco” y “yateví” (Isaza, 1999). La enfermedad se encuentra en el 91% de todo el territorio ubicado bajo los 1.750 msnm (Mesa *et al.*, 2008).

Venezuela

Aquí se observa la coexistencia de diferentes especies del subgénero *Leishmania* están presentes: *L. amazonensis* y *L. venezuelensis*; del subgénero *Viannia*: *L. braziliensis*, *L. panamensis* y *L. colombiensis*. De las 100 especies que se conocen de *Lutzomyia*, 30 son antropofílicas, entre ellas se encuentran *Lu. evansi*, *Lu. longipalpis*, *Lu. flaviscutellata*, *Lu. olmeca bicolor* y *Lu. spinicrassa* (OPS, 1996; Desjeux, 2002). Existe un drástico incremento del número de casos en las últimas décadas, de 600 casos anuales en 1995 a 2000 en 1998 (Desjeux, 2002).

Guyana

Lu. umbratilis es vector de *L. braziliensis* y de *L. guyanensis*, al menos en la region selvática que es semejante a los estados del norte de Brasil (Niederwieser, 2004; Ramírez *et al.*, 2006).

Surinam

L. guyanensis está muy difundida. Están presentes los vectores *Lu. umbratilis* y *Lu. flaviscutellata* (OPS, 1996).

Guayana Francesa

Se ha demostrado la existencia de *L. guyanensis* y *L. braziliensis*. El vector comprobado de *L. guyanensis* es *Lu. umbratilis* (Niederwieser, 2004; Ramírez *et al.*, 2006). La leishmaniasis es una enfermedad de notificación obligatoria (OPS, 1996).

Brasil

El primer caso autóctono de LV fue descrito en 1913 (Killick-Kendrick R, 1999). La leishmaniasis visceral canina está muy difundida e incluye los estados de Bahia, Maranhão, Piauí, Ceará, Alagoas, Distrito Federal, Espírito Santo, Goiás, Mato Grosso, Mato Grosso do Sul, Minas Gerais, Pará, Paraíba, Pernambuco, Rio de Janeiro, Rio Grande do Norte, Roraima, Sergipe, São Paulo y Tocantins registrándose una mayor prevalencia al noreste del país (Palatnik *et al.*, 2001; Diniz *et al.*, 2008). En algunas localidades endémicas están infectados más del 20% de los perros. Está presente *L. chagasi*, *L. guyanensis*, *L. braziliensis*, *L. amazonensis*, *L. lainsoni*, *L. naiffi* y *L. shawi*. Y los vectores *Lu. longipalpis*, *Lu. flaviscullata*, *Lu. olmeca nociva*, *Lu. reducta*, *Lu. wellcomei*, *Lu. whitmani*, *Lu. pessoai* y *Lu. migonei* (OPS, 1996; Ampuero *et al.*, 2005; dos Santos *et al.*, 2008).

En el país, la leishmaniasis causada por *Leishmania (Vianna) braziliensis* constituye el mayor problema de salud pública, solamente entre 1980 al 2005 se han reportado más de 613 644 casos de LC. Además de 60 954 casos de LV es decir a 3300 casos/año (letalidad 6%-8%), con un alto número en el estado de Bahia (16 635), en Maranhão (8 484) y en Minas Gerais (2 018). La proporción de los casos caninos: humanos es de 200:1 (Diniz *et al.*, 2008; Salomon, 2008; Sousa y Pearson, 2009).

El factor desencadenante fue la migración masiva debido a una sequía muy prolongada y a la epidemia de viruela de 1877-1879 que dejó grandes consecuencias socioeconómicas, lo que obligó a aproximadamente 55 000 personas a abandonar sus hogares rurales para establecerse en barriadas construidas de forma precipitada en la periferia de grandes ciudades, donde los perros eran numerosos, las condiciones sanitarias pobres y la severa malnutrición, crearon un hábitad excelente para *Lu. longipalpis* (Desjeux, 2002; Sousa y Pearson, 2009).

Argentina

Están presentes *L. braziliensis*, *L. amazonensis* y *L. guyanensis* (Borda, 2005; Marco *et al.*, 2005). Es una enfermedad endémica en las provincias de Salta, Jujuy, Tucumán, Santiago del Estero, Chaco, Catamarca, Corrientes, Misiones y Formosa (Marco *et al.*, 2005; Misionesalud, 2005). En estas provincias existen distribuidas 20 especies de flebótomos, la principal especie incriminada como vector es *Lu. neivai*, otras especies que podría tener también un papel en la transmisión son *Lu. intermedia*, *Lu. migonei*, ambas por poseer una gran capacidad de colonización de ambientes modificados por el hombre, inclusive peri domésticos (Salomon *et al.*, 2002; Sobrado *et al.*, 2008). La primera descripción de un aislado de *L. (V.) braziliensis* proveniente de caninos fue reportada en la provincia de Salta el 2005, sin embargo el zimodemo KMS 3 aislado, no fue expresado en ninguno de los aislados humanos (Marco *et al.*, 2005). La leishmaniasis es una enfermedad de notificación obligatoria por el médico, veterinario o laboratorista, por escrito, dentro de los 7 días de confirmación según la ley 15465 Decr.Nac. 3640/64 (Salomon, 2008).

Bolivia

Se reportaron *L. chagasi*, *L. braziliensis* y *L. amazonensis*, su vector es *Lu. longipalpis* (OPS, 1996). La región más afectada es la región Yunga (Killick-Kendrick, 1999).

Perú

La leishmaniasis constituye la segunda enfermedad metaxénica de importancia, después de la Malaria, está presente en 19 de los 24 departamentos (MINSA, 2005b). Se han reportado *L. braziliensis*, *L. peruviana*, *L. guyanensis*, *L. lainsoni* y *L. amazonensis*, sólo las dos primeras tienen importancia (MINSA, 1997; Lucas, *et al.*, 1998; MINSA, 2002c).

Se conoce la presencia de 131 especies de *Lutzomyia* en el Perú, de las cuales 5 están incriminadas como vectores: *Lu. peruensis*, en ciertas localidades de la provincia de Otuzco (La Libertad), Bolognesi (Ancash) y en Huarochirí (Lima). *Lu. ayacuchensis*, en las provincias de Parinacochas y Lucanas (Ayacucho). *Lu. tejadai*, en las provincias de Ambo y Huánuco (Huánuco). *Lu. pescei*, implicada como vector en la provincia de Andahuaylas (Apurímac) mediante evidencias epidemiológicas y *Lu. verrucarum*, implicada como vector en localidades de Huarochirí (Lima) (Cáceres y Galati 2001; MINSA, 2002a; Tejada *et al.*, 2003; MINSA, 2005b).

Existen dos formas principales de LC definidas principalmente por características geográficas y clínicas. La leishmaniasis cutánea (uta), que es producida por *L. peruviana*, se presenta en las laderas occidentales de los valles andinos e interandinos, entre 800 y 3000 msnm e inclusive se ha reportado su presencia hasta 600 msnm. Las variables ambientales óptimas para el desarrollo de las *Lutzomyia* aquí son: 80-85 % de humedad relativa, 21±°C de temperatura (Cáceres y Galati, 2001; MINSA, 2002c; MINSA, 2005b).

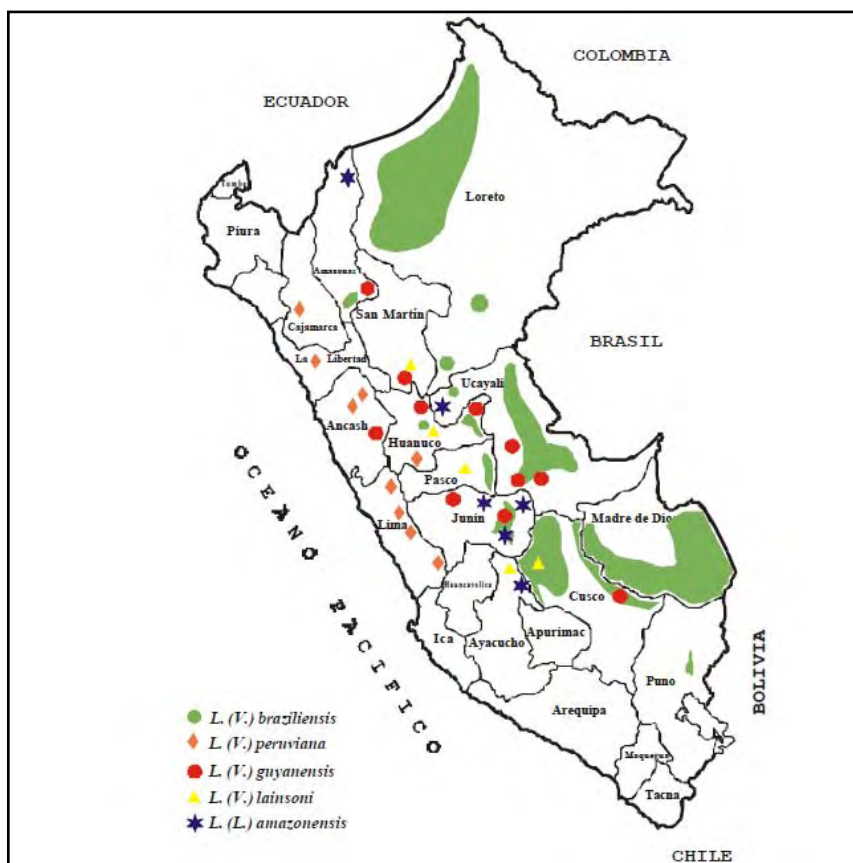
La leishmaniasis muco cutánea (espundia), es producida por *L. braziliensis* que se presenta en la vertiente Oriental, por debajo de los 2000 m.s.n.m. se encuentra en selva baja y ciertos valles de selva alta, desde la cuenca amazónica y en localidades del departamento de Huánuco (Cáceres y Galati, 2001; MINSA, 2002c; MINSA, 2005b).

El 75% a 80% de los casos humanos reportados corresponden a la forma cutánea y el 10% a 25%, a la forma mucocutánea. Además el reporte de una forma clínica en humanos en placa verrucosa con pápulas y algunas ulceraciones, muestra que existe gran diversidad de las formas clínicas cutáneas en el país (Zegarra y Sánchez, 2005).

Los reportes en caninos datan desde 1978 año en que, en un caserío del valle de Tapicara provincia de Huarochirí a 2100 msnm, se observó escasos amastigotes en tres de los 10 perros que fueran examinados por medio de frotis de la piel (Herrer, 2004). En el periodo 1999-2000 la leishmaniasis estuvo presente en el 5.4% de la población canina del distrito de Pampas Grande, Huaraz (Medina, 2002).

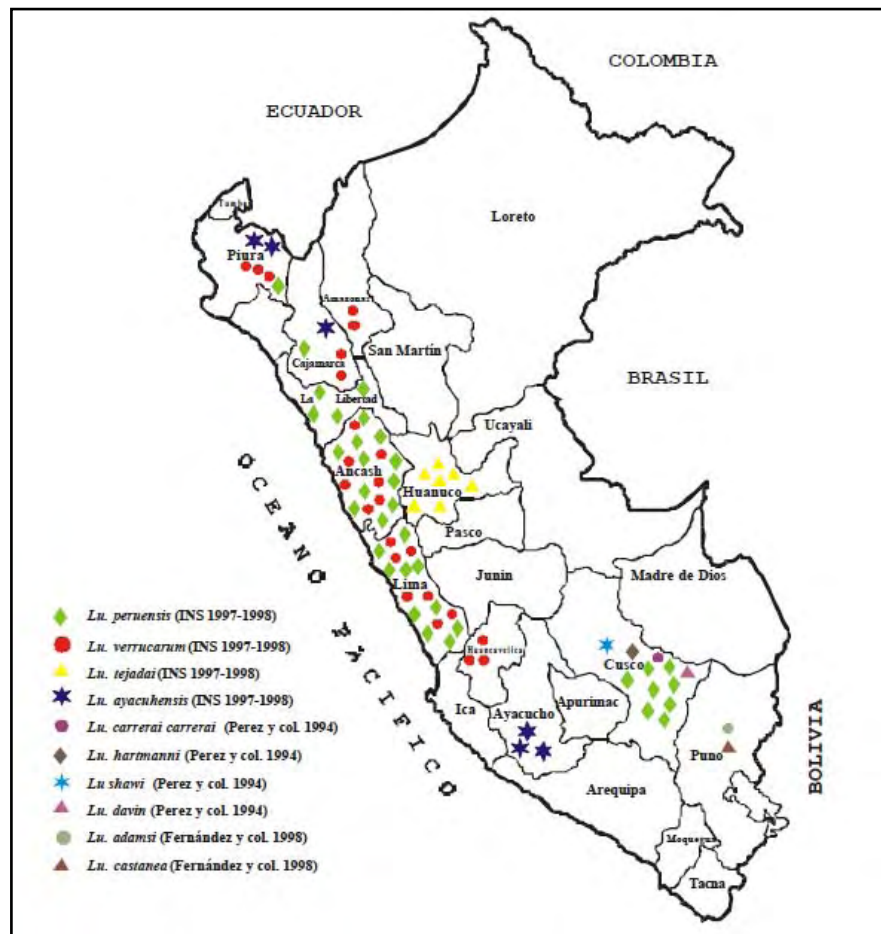
En 1996, se reportaron 7756 casos de leishmaniasis (MINSA, 2002a). Para 1997, se estimó que la zona endémica era de aproximadamente el 74% del área total del país (951820 km²), durante 1999 se reportó un total de 4645 casos (MINSA, 2000).

Figura 20. Distribución por Departamentos en Perú a partir de 350 casos humanos de leishmaniasis



(Fuente: Lucas, *et al.*, 1998)

Figura 21. Distribución Geográfica de *Lutzomyia* sp. en Perú



(Fuente: MINSA, 2000)

Ecuador

Fueron identificadas *L. panamensis*, *L. guyanensis*, *L. braziliensis*, *L. amazonensis* y *L. mexicana*. Al igual que en el Perú, en el Ecuador la uta se manifiesta en las laderas occidentales de los Andes y valles interandinos (Chanchan y Alausi), donde se han encontrado *Lu. peruensis* vector comprobado de *L. mexicana*, a *Lu. verrucarum* se le considera vector potencial. En el Ecuador se han identificado 47 especies de flebótomos. La leishmaniasis es una enfermedad de notificación obligatoria (OPS, 1996; Kato *et al.*, 2005).

Chile y Uruguay

No se conoce la leishmaniasis como enfermedad autóctona. Anualmente se tratan algunos casos importados (Acha y Szyfres, 2003).

9. Enfermedad en el hombre

Se presentan varias formas clínicas que dependen fundamentalmente de los mecanismos patogénicos y la marcada individualidad de la respuesta inmunitaria; por lo que para la mayoría de médicos clínicos es muy difícil diferenciar las subespecies de *Leishmania* sólo por las lesiones que causan (Acha y Szyfres, 2003; Miró, 2007b).

9.1. Leishmaniasis Cutánea (LC)

Sinonimia: Leishmaniosis cutánea, úlcera de los chicleros, espundia, *pian bois*, uta y buba (Alvar, 2001).

Periodo de incubación: Mínimo 1 semana a muchos meses (OPS, 2005).

IDR: Es positiva en LC, LMC, pacientes asintomáticos y con curación clínica (OPS, 1996).

Distribución: Más del 90% de casos a nivel mundial de LC ocurren en Afganistán, Algeria, Brasil, Irán, Iraq, Perú, Arabia Saudita, y Siria. Más del 75% de casos en los que el CDC es consultado en EEUU, son personas con LC adquirida en Latinoamérica, lo que refleja patrones de inmigración (CDC, 2007a).

9.1.1. Subgénero *Leishmania*

a) *Leishmania mexicana mexicana*

Produce una infección benigna con lesión ulcerosa generalmente única. Cuando la picadura es en el pabellón auricular puede producir la pérdida del cartílago, lo que se conoce como “úlceras de los chicleros”, puesto que son los recolectores de caucho, ingrediente básico de la goma de mascar. Cuando se localiza en otras partes del cuerpo se curan en forma espontánea a unos 6 meses. La lesión se inicia con una pápula eritematosa que luego se ulcera y sangra con facilidad al desprenderse la costra, muy raramente se difunde a los ganglios linfáticos (Acha y Szyfres, 2003).

Países afectados: Belice, Colombia, Costa Rica, Ecuador, Estados Unidos, Guatemala, Honduras, México, Panamá, República Dominicana, Venezuela (Alvar, 2001).

b) *Leishmania mexicana amazonensis*

Casos humanos son raros, porque los vectores como *Lu. flaviscutellata* son nocturnos, poco antropofílicos y habitan zonas pantanosas de la selva primaria donde el hombre no suele permanecer (MINSA, 2000; Niederwieser, 2004).

Produce una lesión única o múltiple, que rara vez se cura de forma espontánea, son difíciles de tratar y con alta tendencia (uno de cada tres casos) a evolucionar a la forma difusa. Estos casos presentan pápulas, placas o nódulos extendidos por la piel en zonas expuestas a la luz, sin causar úlceras, cargados de amastigotes y con IDR negativa (Acha y Szyfres, 2003).

Países afectados: Principalmente los que se encuentran en la cuenca amazónica del Brasil y países vecinos Venezuela, Colombia, Ecuador, Guayana francesa, Panamá, Perú, Bolivia (Alvar, 2001).

c) *Leishmania mexicana pifanoi*

Similar en patología y respuesta inmune a la causada por *L. amazonensis*. Produce lesiones cutáneas difusas semejantes a la lepra lepromatosa, obedece a la disminución del sistema inmunológico del paciente. Se presenta principalmente en Venezuela (Acha y Szyfres, 2003).

d) *Leishmania mexicana venezuelensis*

Causa lesiones ulcerosas y, con menor frecuencia, nodulares o ulceronodulares (Acha y Szyfres, 2003).

9.1.2. Subgénero *Viannia*

a) *Leishmania braziliensis braziliensis*

Causa la forma mucocutánea denominada espundia. Ésta se inicia de una lesión cutánea en cualquier parte del organismo donde al cabo de meses o años, por metástasis vía linfática (el 15% de todos los casos) llegan hacia áreas mucocutáneas del cuerpo como nasofaringe, boca y más frecuentemente la parte anterior del tabique nasal. Se forman lesiones nodulares que confluyen y evolucionan a úlceras redondeadas de borde elevado que cursan con secreciones nocturnas que se vuelven sanguinolentas. Finalmente se llega a la perforación del tabique mientras en los bordes de la perforación continúa la actividad destructiva del parásito, cuando hay destrucción total del cartílago nasal se produce una deformación de la nariz conocida como “nariz de tapir”. El diámetro de la perforación aumenta de tamaño y puede comprometer paladar, dorso nasal, labio superior y pómulos, e incluso pérdida franca de masa del macizo facial ocasionando gran deterioro de la calidad de vida del paciente. No es una lesión dolorosa pero tiende a la infección bacteriana que puede complicar gravemente el cuadro (Alvar, 2001).

Países afectados: Argentina, Belice, Bolivia, Brasil, Colombia, Costa Rica, Ecuador, Guatemala, Guayanas británica, francesa y holandesa, Honduras, Nicaragua, Panamá, Paraguay, Perú y Venezuela (Alvar, 2001).

b) *Leishmania braziliensis guyanensis*

Produce lesiones en la piel que con frecuencia se difunde a lo largo de los vasos linfáticos produciendo infarto de cadenas ganglionares. Si hay diseminación linfática, aparecen docenas de lesiones ulceradas en todo el cuerpo denominadas *pian bois* de forma similar a la esporotricosis (MINSA, 2000; Alvar, 2001).

Países afectados: Se presenta en las Guayanas y en el norte del Brasil y Surinam, también en Colombia, Ecuador, Perú, Venezuela (Alvar, 2001; Acha y Szyfres, 2003).

c) *Leishmania braziliensis panamensis*

Causa lesiones ulcerosas de la piel, en el 5% de los casos afecta a las mucosas y también puede causar leishmaniasis cutánea difusa. En la proximidad de las cadenas linfáticas se produce infarto de ganglios en forma de rosario (MINSA, 2000; Acha y Szyfres, 2003).

Países afectados: Aparece en América Central y norte de Sudamérica como Honduras, Nicaragua, Costa Rica, Panamá, Venezuela, Colombia, Ecuador (Acha y Szyfres, 2003).

d) *Leishmania braziliensis peruviana*

Produce una sola lesión sin tendencia a la metástasis, que cura de forma espontánea, es causada por la especie más benigna de todo el subgénero *Viannia*. Causa la leishmaniasis cutánea o “uta”, este término parece proceder de la palabra “hutu” (quechua, “maíz podrido”). Todas las leishmaniosis en América se consideran de origen zoonótico, con excepción de *L. peruviana* que se comporta como una antroponosis donde se discute el papel que pueden jugar los perros, no se conocen los reservorios silvestres del parásito (Alvar, 2001; Acha y Szyfres, 2003).

Países afectados: Perú (Acha y Szyfres, 2003).

9.2. Leishmaniasis Visceral (LV)

Sinonimia: Kala-azar, calazar, fiebre Dum-Dum, ponos, fiebre esplénica infantil, esplenomegalia tropical y leishmaniasis dérmica post-kala-azar.

Periodo de incubación: De 2 a 6 meses, con límites de 10 días a varios años (OPS, 2005).

IDR: En LV sólo indica las infecciones pasadas porque durante la enfermedad activa se produce anergia completa, sólo se hace positiva meses después de la curación del enfermo (OIE, 2008).

Distribución: Más del 90% de casos a nivel mundial de LV ocurren en Bangladesh, Brasil, India, Nepal, y Sudan. Sin embargo en la década pasada, una epidemia de LV se presentó en el sudeste de Europa, principalmente por personas coinfectadas con el virus del Sida. La LV no es común en viajeros (Alvar, 2001; CDC. 2007a).

9.2.1. Subgénero *Leishmania*

a) *Leishmania chagasi*

Se acepta que esta especie tiene variantes bioquímicos dermatropos y viscerotropos. El punto de inoculación suele pasar inadvertido o quizás aparece una lesión primaria o leishmanioma, indurada, que no se ulcera. Desde esta zona los protozoos sobrepasan la respuesta celular Th1 y siguen la respuesta linfocitaria Th2, por lo que no se activan los macrófagos. Después de un periodo de incubación de unos dos meses, pero que puede llegar a dos años aparece la sintomatología secundaria a la invasión de los órganos diana: bazo, hígado, médula ósea, mucosa intestinal, suprarrenales, etc. Los síntomas pueden aparecer de forma súbita o progresiva y son

muy variados. La tríada característica de fiebre, leucopenia (que deriva a pancitopenia) y hepato esplenomegalia (Acha y Szyfres, 2003).

9.3. La leishmaniasis y el sida

La combinación de la leishmaniasis con la infección por el VIH es un nuevo cuadro patológico que ha de abordarse con urgencia, pues ha sido reportada en 34 países. Incluso cuando los pacientes coinfectados reciben tratamiento adecuado, las recaídas son frecuentes y el desenlace suele ser fatal (Desjeux, 2002; OMS, 2007; Chandra *et al.*, 2009).

Ambas infecciones tienden mutuamente a reforzar su impacto sobre el sistema inmunológico, acortando el periodo de incubación e incrementando la progresión de las enfermedades. La leishmaniasis se manifiesta clínicamente de forma atípica y severa, la leishmaniasis visceral aparece en el 75–90% de los casos y el resto se reparte en formas cutáneas, mucocutáneas y cutáneas difusas afecta a órganos inusuales como piel aparentemente sana, pulmón y tracto digestivo. (Desjeux, 2002; Vásquez, 2006; Sousa y Pearson, 2009).

El contagio se produce cuando comparten las jeringuillas, pues se ha comprobado que al alimentar experimentalmente flebótomos de una colonia de laboratorio con sangre de enfermos coinfectados con sida, la infección en los insectos se reproduce en el 100% de los casos a pesar de que sólo ingieren 0,5 μ litros de sangre, lo que significa la abundancia de macrófagos circulantes parasitados. La transmisión mecánica al compartir jeringuillas con gran cantidad de sangre (0,3 ml de promedio) sería mucho más fácil. El 52% de los frotis sanguíneos de los enfermos coinfectados presenta macrófagos parasitados en sangre periférica (Alvar, 2001).

10. Patogenia

10.1. Inoculación

Cuando un flebótomo parasitado ingurgita sangre de un vertebrado inyecta en la dermis 10, 100, 200 y hasta 1000 promastigotes metacíclicos presentes en su probóscide (García, 2005; Zegarra y Sánchez, 2005; Roberts, 2006). La saliva que *Lu. longipalpis* deja en el hospedero, mientras obtiene sangre, contiene proteínas hemostáticas. Entre ellas el péptido maxadilan (MAX) de aproximadamente 7 kDa, el cual es un potente vasodilatador que promueve la dilatación de capilares que luego son fácilmente rotos por la probóscide del insecto, de esta manera hay más sangre intradérmica para que el flebótomo se alimente, lo que contribuye a aumentar el tamaño de la lesión cutánea y también al vehicular a los promastigotes permite que fluyan con facilidad desde la probóscide del vector hacia la dermis del vertebrado y a que se difundan a partir del punto de inoculación (Milleron *et al.*, 2004). Otros componentes protéicos de la saliva son la adenosina, su precursor 5'AMP, hialuronidasa y desintegrinas también son vasodilatadores, anticoagulantes y aumentan la quimiotaxis de los macrófagos (Ramírez *et al.*, 2006).

De esta manera la saliva de *Lu. longipalpis* juega un rol en el establecimiento y exacerbación de las lesiones (Milleron *et al.*, 2004).

En algunas especies de flebótomos la picadura es muy dolorosa, y deja una mancha roja y circular, mientras que en otras no se sienten, esto sugiere que la saliva de algunas especies contiene una sustancia con propiedades anestésicas locales (Killick-Kendrick, 1999; MINSA, 2000).

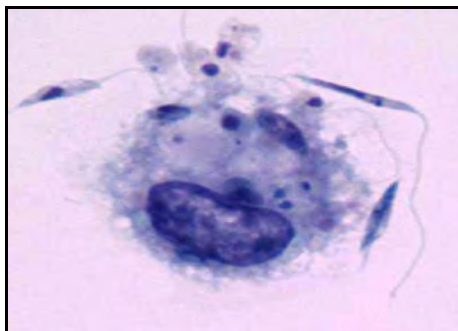
10.2. Inflamación

Una vez que los parásitos se encuentren en el espacio dérmico se produce una reacción inflamatoria local, con acumulación de células de Langerhans, inicialmente neutrófilos y eosinófilos, seguidos de macrófagos y tardíamente de linfocitos (Silva *et al.*, 2005; Ramírez *et al.*, 2006).

10.3. Internalización de *Leishmania*

La opsonización dependiente del complemento y la opsonización mediada por anticuerpos incrementan la fagocitosis en los macrófagos (Noli, 1999; Ferrer, 2002; Stuart *et al.*, 2008). El primero se produce cuando la proteína sérica C3 del complemento se deposita en la superficie del protozoario y es fijado por el LPG. De esta forma los receptores de complemento del macrófago CR1 y CR3 permiten el anclaje a la membrana celular mediante una estructura glucosil-fosfatidil-inositol (GPI) y se produce la internalización del parásito por fagocitosis. La gp63 también permite la penetración en el macrófago directamente o por el receptor C3 (Gonçalves *et al.*, 2004; Ramírez *et al.*, 2006; Martínez *et al.*, 2008).

Figura 22. Interacción de un macrófago con varios promastigotes. Tinción Giemsa 1000x



(Fuente: Gonçalves *et al.*, 2004)

10.4. De promastigotes a amastigotes

Los promastigotes una vez dentro del macrófago son englobados en el fagosoma en cuestión de minutos, unidades repetidas de LPG, la gp63 y la gp46 de *Leishmania* inhiben transitoriamente la fusión del fagosoma con el lisosoma lo que permite la diferenciación a formas amastigote resistentes a la degradación de múltiples enzimas microbicidas como las hidrolasas y peptidasas lisosomales (con acción hidrolítica y proteolítica) y el pH ácido. Los promastigotes antes de las primeras 24 horas se transforman nuevamente en amastigotes (Santos *et al.*, 2000; Alvar, 2001; Ferrer, 2002; Miró, 2007b; Martínez *et al.*, 2008).

En este proceso de evasión de la digestión celular intervienen otros mecanismos desarrollados por *Leishmania*. Los radicales oxidativos con actividad anti-*Leishmania* comprobada son el anión superóxido (O_2^-), el óxido nítrico (NO), el peróxido de hidrógeno y el S-nitrosotiol. Sin embargo *Leishmania* bloquea el estallido respiratorio de los macrófagos, los neutrófilos y los eosinófilos que deberían producir la muerte del parásito, para lograrlo induce una menor respuesta oxidativa o destruye y detoxifica los radicales (Hernández y Becker, 2006; Miró, 2007b).

10.5. Diseminación de amastigotes

La multiplicación intravacuolar de amastigotes ocurre por fisión binaria, hasta que el macrófago queda repleto de amastigotes, momento en el que se rompe y se liberan los amastigotes al espacio extracelular, donde serán nuevamente fagocitados por otros macrófagos (Ramírez *et al.*, 2006).

Las células dendríticas también fagocitan a los promastigotes, se dirigen por los vasos linfáticos aferentes, hacia el ganglio linfático próximo entre las 24-96 horas de la inoculación (Hernández y Becker, 2006). Se produce una rápida diseminación de parásitos poco después de la inoculación, por vía linfática o vía sanguínea, gracias a los macrófagos y monocitos (García, 2005; Lipoldová y Demant, 2006).

En la Lcan es raro que se desarrollen lesiones cutáneas primarias en el punto de inoculación (leishmanioma, Botón de Oriente), al contrario de lo que ocurre en la humana y en animales de experimentación. La aparición del proceso inflamatorio se produce a las pocas semanas de la infección. La diseminación es generalizada (linfonódulos, bazo, médula ósea,

hígado, riñones, páncreas, testículos, pulmones, ojos y articulaciones) y se observan los macrófagos con un número variable de amastigotes. En animales susceptibles la infección rápidamente se disemina en tejidos y órganos linforeticulares como linfonódulos, bazo y médula ósea a las pocas horas. En animales resistentes los parásitos están delimitados en la piel (o alcanzan solamente el linfonódulo local) (Santos *et al.*, 2000; Ferrer, 2002).

10.6. Inmunocomplejos Circulantes

Los fenómenos de hipersensibilidad tipo III o mediada por complejos inmunitarios son generados por estimulación policlonal de células B, lo que origina una alta concentración de globulinas por producción de IgG específica e inespecífica, originando hiperglobulinemia que lleva a hiperproteinemia. El resultado final es la alteración del sistema de coagulación y el flujo sanguíneo produciéndose inflamación y lisis del endotelio vascular o vasculitis. El reclutamiento de neutrófilos y monocitos que activados por citoquinas proinflamatorias vierten en estos lugares enzimas, radicales libres, óxido nítrico, etc., se traduce en un fenómeno de hipersensibilidad tipo IV o mediada por células T de tipo crónico muy lesiva para el organismo (Castagnaro *et al.*, 2007; Miró, 2007b; Zárate *et al.*, 2007).

Las infecciones no controladas determinan la aparición en el tiempo de las consecuencias de la acción de los mecanismos de defensa y ataque frente a los parásitos, siendo éstos especialmente evidentes en las denominadas barreras de filtración. Tal es el caso de órganos como riñón y ojo en los que la enfermedad por inmunocomplejos causa graves lesiones. La patología renal está presente en la mayoría de perros infectados, incluso sin manifestaciones clínicas. Los estudios inmunológicos en fluidos como orina, humor acuoso y líquido cefalorraquídeo, han puesto en evidencia la capacidad de *Leishmania* de causar daño inmunomediado en las correspondientes barreras de filtración lo que posibilita el paso de anticuerpos a dichos fluidos (Castagnaro *et al.*, 2007; Miró, 2007b; Zárate *et al.*, 2007).

10.7. Patogenia del daño renal

La glomerulonefritis (GN) se inicia cuando los inmunocomplejos circulantes (unión del antígeno e IgG) se depositan en la pared de los capilares glomerulares (Castagnaro *et al.*, 2007; Miró, 2007b). Esto induce la activación del complemento por la vía clásica (fracciones C1, C2 y C4), produciéndose la solubilización de los inmunocomplejos y su fagocitosis por macrófagos y neutrófilos. Los componentes C3a y C5a del complemento actúan reclutando las células inmunitarias promoviendo el desarrollo de inflamación local y dañando el nefrón. Además hay infiltración de linfocitos debido a que algunas interleuquinas producidas por macrófagos ejercen una acción quimiotáctica sobre ellos (Castagnaro *et al.*, 2007; Miró, 2007b).

El glomérulo responde a estas lesiones mediante una proliferación celular y mesangial, y un engrosamiento de la membrana basal del glomerular. Según criterios anatomopatológicos, las

GN en la leishmaniasis se clasifican como GN membranosa, GN membranoproliferativa, GN mesangioproliferativa y GN focal segmentada (Miró, 2007b). Según la clasificación de la OMS, la GN membranoproliferativa se subdivide basándose en las alteraciones ultraestructurales de la membrana basal del glomérulo, como tipo I (depósitos subendoteliales), tipo II (depósitos intramembranosos densos) y tipo III (depósitos subendoteliales y mesangiales) (Aresu *et al.*, 2007).

De esta manera la activación del sistema inmune causa una severa inflamación glomerular. Las lesiones túbulo intersticiales son menos frecuentes que las glomerulares y aparecen como consecuencia de la evolución de la lesión glomerular (Miró, 2007b).

En condiciones normales, el glomérulo permite la filtración de proteínas con peso molecular igual o menor a 69 kD (lisosima, β 2-globulina) y pequeñas cantidades de albúmina (=69 kD). El túbulo contorneado proximal tiene el rol de reabsorber estas proteínas filtradas por el glomérulo y en orina sus concentraciones son mínimas. Las proteínas con peso molecular alto son retenidas en el torrente sanguíneo (transferrina, inmunoglobulinas). Además en la superficie de la membrana basal del glomérulo hay varias cargas negativas que se oponen a la filtración de proteínas con carga negativa (albúminas) (Castagnaro *et al.*, 2007).

Si la integridad tubular es mantenida puede reabsorber la proteína en exceso, si los receptores tubulares se saturan, la cantidad de proteína en orina aumenta (poliuria) y es posible hallar proteínas con alto y bajo peso molecular en altas concentraciones. En leishmaniasis el infiltrado inflamatorio induce el depósito de inmunocomplejos en glomérulos y túbulos por lo que el daño es de tipo mixto y es detectable proteinuria de ambos orígenes (Castagnaro *et al.*, 2007).

La proteinuria contribuye a la progresión de la enfermedad renal porque favorece la proliferación celular y el aumento de la matriz mesangial. Además, el exceso de proteínas en el filtrado glomerular resulta tóxico para las células epiteliales tubulares lo que desemboca en inflamación intersticial, fibrosis y muerte de las células tubulares. En estadios iniciales las lesiones glomerulares pueden ser reversibles, permanecer estables durante largos periodos de tiempo o ser progresivas. En este último caso, termina produciéndose una esclerosis glomerular irreversible que daña la totalidad de la nefrona, con el consiguiente descenso en la tasa de filtración glomerular (Miró, 2007b).

En los animales con enfermedad renal crónica (ERC) están presentes una serie de procesos (retención de sodio y expansión del fluido extracelular, activación del sistema renina-angiotensina-aldosterona, hiperactividad del sistema nervioso simpático e incremento en la resistencia vascular periférica) que afectan a la regulación de la presión arterial (PA) y favorecen el desarrollo de hipertensión arterial sistémica (HAS) (Miró, 2007b).

La HAS incrementa el riesgo de presentar crisis urémicas, acelera la progresión del fallo renal, provocando una disminución de la tasa de filtración glomerular, aumenta la severidad de la proteinuria y de las lesiones renales e incrementa la mortalidad. También es responsable de la aparición de lesiones a nivel cardíaco (hipertrofia ventricular, disfunción diastólica, arritmias

ventriculares, insuficiencia mitral y/o aórtica), ocular (desprendimiento de retina, hemorragias retinianas y vítreas, glaucoma) y nerviosos (convulsiones, cambios de comportamiento (Miró, 2007b).

10.8. Lesiones

Una vez generada la infección, se producen alteraciones prácticamente en la totalidad del organismo de diferente tipo y magnitud, dependiente de la respuesta inmune desarrollada y el tiempo de infección. Existe una marcada evolución a la cronicidad con procesos inflamatorios en primera instancia de tipo proliferativo y posteriormente de tipo degenerativo, junto a lesiones de origen inmunopatológico (Miró, 2007b).

10.8.1. Lesiones Macroscópicas

Estado general: En fase terminal se observa caquexia.

Lesiones cutáneas: Amplias áreas de alopecia con descamación. Menos frecuente unas cuantas úlceras pequeñas o nódulos. Ulceraciones y petequias pueden ser vistas ocasionalmente en las membranas mucosas (Ferrer, 2002). Sin embargo los perros infectados crónicamente pueden mantener una apariencia normal de la piel (sin lesiones groseras), lo que confirma su importante rol en la transmisión (Costa *et al.*, 2008).

Riñones: Ligeramente fibrosos al corte, en particular hacia los polos de ambos riñones (Zárate *et al.*, 2007).

Hígado: Algunas veces aumentado de tamaño, congestionado y con bordes redondeados (Zárate *et al.*, 2007).

Bazo: Esplenomegalia, congestión y bordes redondeados (Zárate *et al.*, 2007).

Linfonódulos: Linfadenomegalia (Adamama *et al.*, 2007).

Intestinos: El colon áreas hiperémicas, la mucosa puede estar con áreas erosionadas y edematosas (Adamama *et al.*, 2007).

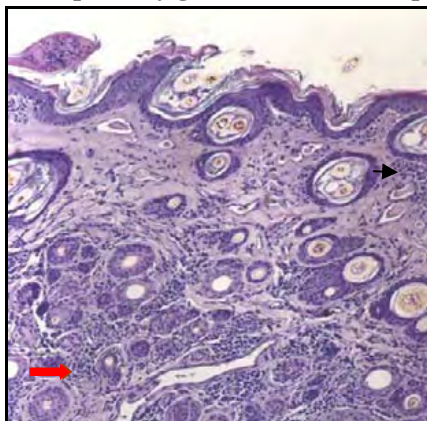
10.8.2. Lesiones Microscópicas

La primera reacción frente a la presencia del parásito en los tejidos, consiste en un infiltrado de polimorfonucleares neutrófilos, que en seguida es reemplazado por infiltrado linfoplasmocitario. Conforme progresa la lesión se observa una inflamación crónica frecuentemente granulomatosa pudiendo ser piogranulomatosa, con fenómenos necróticos en el infiltrado celular, puede observarse vasculitis. Las áreas de necrosis son parcialmente rodeadas por macrófagos activados y por células gigantes (MINSA, 2000; Castagnaro *et al.*, 2007). Los granulomas bien definidos sugieren el establecimiento de una eficiente inmunidad celular lo que lleva al establecimiento de una infección crónica con baja carga parasitaria y signos clínicos indetectables (Sanchez *et al.*, 2004).

a) Piel

Las lesiones histológicas no son específicas, se observa una reacción inflamatoria crónica no supurativa, difusa en la dermis y focal alrededor de glándulas de la dermis, en la mayoría de las lesiones se observan células epitelioides granulomatosas, degeneración fibrinoide, vasculitis, fibrosis de la dermis con discreta infiltración mononuclear (linfocitos y macrófagos). No siempre pueden observarse amastigotes (Roura, 2008). También se puede observar inflamación piogranulomatosa (Univet, 2007). Degeneración de las células epiteliales (Diniz *et al.*, 2005). Dermatitis granulomatosa nodular a difusa. Inicialmente la reacción es localizada alrededor de folículos pilosos y glándulas sebáceas (adenitis granulomatosa sebácea), paniculitis difusa granulomatosa, dermatitis pustular sub corneal, vasculitis de tipo mixto (neutrófilica-linfocítica) (Ferrer, 2002).

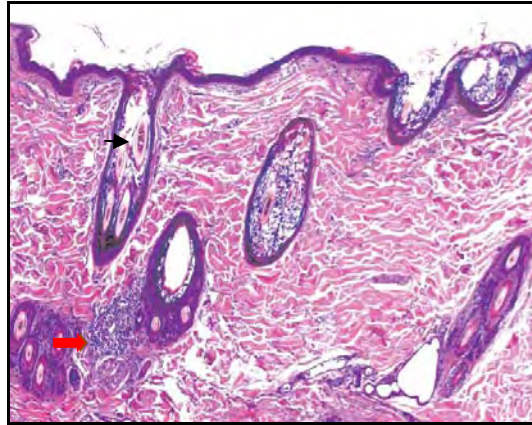
Figura 23. Oreja. Canino. Inflamación difusa en dermis capa externa (→) y focal alrededor de folículos pilosos y glándulas en dermis profunda (→→). HE 40x.



(Coura *et al.*, 2006)

Figura 24. Piel. Canino. Hiperplasia epitelial, dilatación de los

infundíbulos foliculares con gran acumulación de queratina(➡). En dermis focos de infiltrado inflamatorio granulomatoso(➡). HE 40x.



(Fuente: Cortadellas y Chalmeta, 2007)

b) Hígado

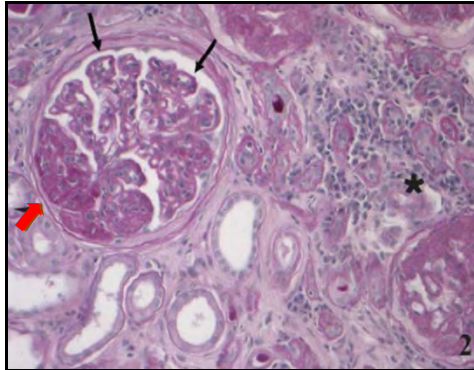
La secuencia lesional comienza con una degeneración vacuolar de hepatocitos que llevan a cambios grasos, hipertrofia e hiperplasia de las células de Kupffer, en la microscopía se observa una hepatitis serosa aguda con intenso edema inflamatorio e hiperemia pasiva que configura un hígado de estasis y que junto a fenómenos de esteatosis pueden dar apariencia de hígado en nuez moscada. Con posterioridad debido a las alteraciones vasculares y daños endoteliales se inician los procesos degenerativos. También se observan fenómenos de tipo proliferativo que configura una hepatitis granulomatosa. Finalmente como consecuencia de los trastornos vasculares y procesos degenerativos, se inician los fenómenos de necrosis simple celular que conducen a una hepatitis necrótica centrolobulillar. La reducción de la protrombina favorece la aparición de las hemorragias (sobre todo, epistaxis) (Miró, 2007b; Zárate *et al.*, 2007).

c) Riñón

El cuadro lesional puede ser variado, desde solo glomerulonefritis de cambios mínimos acompañados de pocas inmunoglobulinas circulantes, hasta diferentes tipos de glomerulonefritis membranoproliferativa y nefritis intersticial acompañada de depósitos de material proteínico en el espacio de Bowman, presencia de cilindros hialinos en túbulos contorneados, degeneración y necrosis de las células del epitelio de los túbulos, como consecuencia de los inmunocomplejos (Ferrer, 2002; Miró, *et al.*, 2007; Zárate *et al.*, 2007).

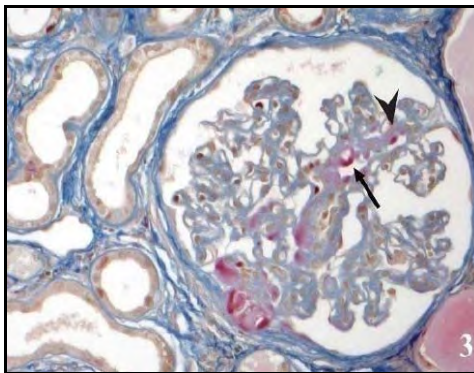
Figura 25. Riñón. Canino. Paredes engrosadas del vaso

capilar (→) y glomérulo esclerosis (→) en un glomérulo asociado con nefritis intersticial (*). Acid2Schiff 40x.



(Fuente: Aresu *et al.*, 2007)

Figura 26. Riñón. Canino. Depósitos coloreados de rojo en la Pared del capilar (→) y el mesangium (→) y túbulos renales con proteína. Acid fuchsin orange 100x.



(Fuente: Aresu *et al.*, 2007)

d) Médula ósea

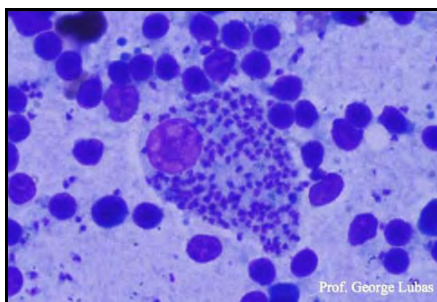
La hematopoyesis va alterándose, disminuyendo con el transcurso de la enfermedad, dando lugar a una mielopatía involutiva arregenerativa con depleción de las series eritroblástica, leucoblástica y megacarioblástica junto con un aumento de plasmocitos y depósitos de hemosiderina. La consecuencia es una tendencia a la pancitopenia. La degeneración hipoplásica cursa con disminución de células precursoras y alteración en el proceso de maduración celular, lo que contribuye a la anemia (OPS, 1996; Castagnaro *et al.*, 2007; Miró, 2007b).

e) Órganos linfoides

En procesos agudos e iniciales predominan en los centros germinales (regiones de linfocitos B) la hipertrofia de folículos linfoides con abundantes linfoblastos, muchas figuras mitóticas y contrariamente en zonas paracorticales (regiones de linfocitos T) existe una disminución

moderada de la población de linfocitos y aumento de macrófagos y células plasmáticas. Así mismo se observan fenómenos de hemosiderosis que le confiere un aspecto hemorrágico a los ganglios linfáticos. El examen citológico de ganglio linfático se clasifica como reactivo, es decir, predominio de linfocitos sobre linfoblastos junto a la presencia de células plasmáticas y macrófagos (parasitados o no). En fases avanzadas o crónicas predominan los fenómenos de linfocitolisis a nivel de centros germinativos e intensa plasmocitosis a nivel medular (Ferrer, 2002; Miró, 2007b; Roura, 2007).

Figura 27. Canino. Citología de ganglio linfático



(Fuente: Gruppo Leishmania, 2009)

f) Las vasculitis

Inducidas por inmunocomplejos que activados por la cascada del complemento es un importante mecanismo patológico responsable de la necrosis tisular y responsable de las lesiones oculares, piel y vísceras (Baneth, 2007).

g) Ojos

La uveítis es el resultado de la destrucción directa de las glándulas lagrimales y Meibomianas, debido a la inflamación piogranulomatosa u obstrucción de los ductos de secreción debido a la inflamación de estructuras adyacentes. La KCS es el resultado de la hiposecreción de lágrimas que se produce por el daño de la córnea (Komnenou y Koutinas, 2007).

h) Sistema nervioso

La reacción granulomatosa que produce el parásito está descrita en casi todos los órganos del cuerpo, incluido el sistema nervioso central. Hay presencia de anticuerpos en el humor acuoso y líquido cefalorraquídeo (LCR). La plexocoroiditis es el hallazgo más constante, se caracteriza por el depósito de inmunocomplejos en zonas subepiteliales e intersticiales del epéndimo derivadas de las alteraciones vasculares que permiten su salida al intersticio y al LCR. La meningitis por invasión parasitaria y formación de granulomas linfoplasmocelulares son observadas (Noli, 1999; Ferrer, 2002; Castagnaro *et al.*, 2007; Miró, 2007b).

i) Articulaciones

En artritis se puede obtener fluido sinovial para detectar anticuerpos (Castagnaro *et al.*, 2007).

j) Sistema digestivo

La presencia de diarrea está asociada con la falla renal o hepática, en algunos casos está atribuida a la infiltración de los parásitos en la mucosa intestinal lo que produce degeneración de las células epiteliales e inflamación piogranulomatosa o granulomatosa donde se puede observar gastritis y enteritis catarral aguda a necrótica descamativa. Este cuadro desencadena un síndrome de mala absorción (Diniz *et al.*, 2005; Adamama *et al.*, 2007; Miró, 2007b).

k) Sistema reproductor

Degeneración de las células epiteliales e inflamación (Diniz *et al.*, 2005).

11. Respuesta inmune

La diseminación en el cuerpo y el desarrollo de la enfermedad depende del tipo y de la eficiencia de la respuesta inmunitaria del perro infectado (Castagnaro *et al.*, 2007). Una vez que los parásitos se encuentren en el espacio dérmico se produce una reacción inflamatoria local, con acumulación de células de Langerhans, inicialmente neutrófilos y eosinófilos, seguidos de macrófagos, células NK y tardíamente de linfocitos (Ramírez *et al.*, 2006). *Leishmania* es un parásito intracelular que puede localizarse en monocitos, macrófagos, neutrófilos, eosinófilos, mastocitos, células dendríticas e incluso fibroblastos, quines son capaces de fagocitar y albergar parásitos en su interior (Minero *et al.*, 2004; Lipoldová y Demant, 2006).

a) Células dendríticas (CD)

Pertenece a la serie de fagocitos mononucleares. Las células de Langerhans están presentes en toda la epidermis, son capaces de captar los antígenos de *Leishmania* y transportarlos hacia los ganglios linfáticos de drenaje. Carecen de función microbicida por lo que pueden servir de reservorio del parásito y contribuir a su diseminación. Son muy eficientes presentadoras de antígenos a los linfocitos T auxiliares *in vivo* e *in vitro*, la IL-12 que producen promueve la polarización de las células T hacia Th1 (Tizard, 1998; Niederwieser, 2004).

b) Polimorfonucleares

Son la primera y más significativa población en llegar a la piel luego de inyectar los parásitos. La quimiotaxis es inducida indirectamente por estímulos generados por células como macrófagos, queratinocitos y células endoteliales mediante la producción de citocinas (IL-8, las proteínas inflamatorias del macrófago α y β y la proteína quimiotáctica del macrófago 1). Y directamente cuando es inducida por moléculas propias del parásito (Bonilla, 2005).

Los neutrófilos internalizan a *Leishmania* a través del receptor de complemento (CR) y la fibronectina. Debido a que estas células pueden actuar como hospederos para la entrada y la replicación del parásito, una mayor viabilidad celular favorece la perdurabilidad y la diseminación de la infección. Por ello tienen un papel dual, actuando como controlador del parásito o como favorecedor del desarrollo de lesión (Bonilla, 2005).

Los eosinófilos tienen un papel benéfico en la infección por *Leishmania* pues en el modelo murino, se ha encontrado una mayor cantidad de parásitos lisados en la vecindad de los gránulos de los eosinófilos, una relación directa entre la presencia de eosinófilos y una mayor respuesta linfoproliferativa *in vitro* a antígenos de *Leishmania*, y una asociación entre la presencia de eosinófilos y la ausencia de amastigotes en la lesión (Bonilla, 2005).

c) Mastocitos

Tendrían un papel perjudicial, al producir histamina que puede bloquear la producción de citocinas protectoras y alterar la maduración de células dendríticas hacia tipo Th2, favoreciendo la susceptibilidad a la infección (Bonilla, 2005).

d) Monocitos y Macrófagos

Uno o dos días más tarde llegan los macrófagos que internaliza a *Leishmania* a través de receptores específicos (receptores del complemento CR3, CR1, CR2, CR4 o inmunoglobulinas que opsonizaron al parásito). Los ligandos de *Leishmania* para estos receptores son los glucoconjugados de su superficie como el LPG y la gp63. Así los macrófagos inducen la producción de IL1, IL6, IL12 y TNF α (Gonçalves *et al.*, 2004; Ramírez *et al.*, 2006; Martínez *et al.*, 2008).

e) Linfocitos

Entre la primera y la segunda semana arriban los linfocitos T específicos y completan el equipo celular de defensa (Bonilla, 2005). Los linfocitos T auxiliares CD4⁺ direccionarán la respuesta hacia la protección o a la progresión de la enfermedad (Castagnaro *et al.*, 2007). Las células T CD8⁺ participan al liberar citocinas como IL-2, IFN- γ y TNF α en menor magnitud que los linfocitos T CD4⁺. De ésta manera los linfocitos T CD8⁺ participan de modo positivo en el control de la infección por *Leishmania* (Hernández y Becker, 2006).

Las células NK cuando se activan incrementan la actividad proliferativa y citotóxica por lo que tienen un papel benéfico. Durante la infección por *Leishmania*, las células NK son activadas a través de citocinas. Sin embargo, el parásito logra impedir la activación de estas células al inhibir la producción de IL-12 (Bonilla, 2005).

f) Presentación de los antígenos

El antígeno de *Leishmania* procesado es presentado por las células dendríticas, macrófagos y linfocitos B, a la población de linfocitos llamada linfocitos T auxiliares. Para esto las células dendríticas que han fagocitado a los promastigotes, se dirigen por los vasos linfáticos aferentes, hacia el ganglio linfático próximo (Hernández y Becker, 2006; Ramírez *et al.*, 2006).

g) Complejo Mayor de Histocompatibilidad (CMH)

Las proteínas liberadas de los parásitos en el interior de los macrófagos, se asocian a las moléculas del CMH, que actúan como transportadoras de antígenos a la superficie del macrófago. Cuando se asocian a las CMH clase I, los antígenos son reconocidos por las células T del tipo CD8+ (Tc citóticas) mientras que cuando se asocian a las de la clase II son reconocidos por las células T del tipo CD4+ (Th o cooperadoras). La activación de las células Tc permite la producción de una citotoxina que provoca la lisis del parásito, así como de citocinas que activan a los macrófagos. La activación de las células Th permite establecer dos tipos de respuesta según se expresen las subpoblaciones Th1 o Th2 (Gállego y Riera, 2007).

h) Interacción entre receptores de las CPA y los ligandos del linfocito T

Además del antígeno y del MHC, se necesita CD4 para lograr una presentación óptima y dos señales para inducir una respuesta óptima. Una señal proviene de las citocinas secretadas por las células presentadoras de antígenos, comprenden las IL-1 y IL-12. Y la otra señal es el efecto de la unión entre las células T y las CPA, por lo tanto abarca a las moléculas de adherencia de la superficie celular. En este proceso participan pares interactivos de moléculas como CD40 que se expresa en las CPA se enlaza a su contra receptor, el ligando CD40 de las células T auxiliares activadas, después de estimular a la célula T para que exprese CD28. A su vez CD28 se une débilmente con la CPA (con CD80 en los macrófagos y CD86 en las células B), este enlace estimula a la célula T para que exprese CTLA-4, éste se une a CD80 o CD86 con mucha más fuerza que CD28. El parásito produce un fallo en la expresión de moléculas coestimuladoras como CD80, CD86 y CD40 en la membrana de las CPA (Tizard, 1998; Ramírez *et al.*, 2006).

i) Transducción de señales

Luego de la unión del antígeno que expresa la CPA al TCR, se transmite una señal desde las cadenas enlazadoras del antígeno hasta las cadenas de transducción del TCR. Esto provoca la activación de cinasas citoplásmicas de tirosina que fosforilan y activan a la fosfolipasa C de la membrana celular, la cual hidroliza al difosfato de fosfatidilinositol, para producir el trifosfato de inositol y el diacilglicerol. El trifosfato de inositol libera los iones de calcio a partir de los orgánulos intracelulares, y abre los canales, permitiendo la entrada de Ca^{++} hacia la célula. Como consecuencia se eleva el calcio intra celular, el calcio provoca el traslado de la proteína cinasa C desde el citoplasma hasta la membrana celular donde es activada por el diacilglicerol. La

activación de la cinasas proteínicas estimula la activación de varios factores de transcripción que regulan la expresión genética para una serie de proteínas nuevas (Tizard, 1998).

j) Superpoblaciones de células T auxiliares

Existen dos subconjuntos distintos de linfocitos T auxiliares CD4+: Th1 y Th2, que se distinguen por la combinación de citocinas que secretan pues tienen funciones efectoras diferentes (Hernández y Becker, 2006). Estas moléculas solubles son importantes para regular el funcionamiento celular como la migración, la activación y la inhibición. Pueden ser inducidas directamente por el parásito o por neutrófilos, macrófagos o linfocitos, a través de receptores y de otras citocinas. Dependiendo de las citoquinas que actúen en los primeros momentos de la infección, la respuesta se decantará hacia la protección (respuesta Th1) o a la progresión (respuesta Th2) (Piscopo y Mallia, 2006; Roberts, 2006; Castagnaro *et al.*, 2007).

k) Respuesta Th1 protectora

Las células Th1 producen principalmente IL-2, IFN- γ y TNF α durante las primeras horas que siguen a la estimulación por el antígeno, por CD80 y por la IL-12 (Ramírez *et al.*, 2006).

El IFN- γ es conocido como el factor de activación de los macrófagos para matar a *Leishmania* al diferenciar linfocitos CD4+ en las células propias de la respuesta Th1 (MINSA, 2000).

La IL-12 es producida por las células dendríticas, macrófagos y linfocitos B, e induce la formación de IFN- γ , los linfocitos T citotóxicos (CD8) y las células asesinas naturales (NK), promoviendo la polarización de las células T hacia Th1 (Niederwieser, 2004; Roberts, 2006).

La IL-1 y TNF- α son producidas por macrófagos activados, células dendríticas, células endoteliales, fibroblastos, linfocitos T y B. Estas dos citocinas tienen propiedades similares y actúan de forma sinérgica. Son responsables de la aparición de sueño, fiebre, anorexia y neutrofilia que caracterizan la respuesta inflamatoria (Ramírez *et al.*, 2006).

l) Respuesta Th2 no protectora

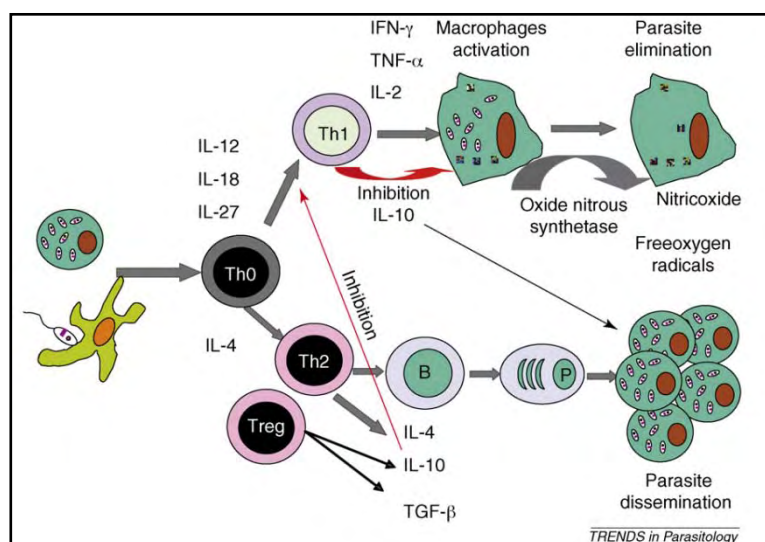
Las células Th2 secretan IL-4, IL-5, IL-10 e IL-13 varios días después de la exposición al antígeno, por CD86 y por la IL-1. Las células Th2 poseen receptores IL-1 y requieren esta sustancia proveniente de los macrófagos o las células dendríticas como coestimuladores (Roberts, 2006; Stuart *et al.*, 2008). Los eosinófilos y los mastocitos pueden secretar IL-4, IL-5 e IL-10 (Hernández y Becker, 2006).

Los amastigotes pueden inducir a los macrófagos a una intensa producción de IL-10. La IL-10 ejerce influencia directa e indirecta en la progresión de la enfermedad al tener un efecto antagónico sobre los macrófagos al hacerlos refractarios o poco susceptibles para la activación por

IFN γ , logrando que no se activen y disminuyan su producción de IL-12 y TNF α , resultando impedir la lisis del parásito (Miles *et al.*, 2005; Hernández y Becker, 2006).

De esta manera, esta mezcla de citoquinas inhibe la proliferación de la respuesta Th1. También estimulan la proliferación de células B y la secreción de inmunoglobulinas principalmente IgG, las cuales no solo fallan en proteger contra el agente patógeno de localización intracelular sino que contribuye a la progresión de la enfermedad debido a que induce a los macrófagos a producir IL-10, e induce a macrófagos y a las CPA a no producir IL-12 (Miles *et al.*, 2005; Hernández y Becker, 2006). Se ha demostrado que altas cantidades de anticuerpos antileishmania en humanos con LV se correlaciona con el pico de la parasitemia y con una IDR negativa, el tratamiento exitoso resulta en una disminución de los títulos de anticuerpos y una restauración de la positividad a la IDR (Miles *et al.*, 2005).

Figura 28. Reacción inmunitaria a *Leishmania*. La susceptibilidad y resistencia al patógeno dependen del patrón de citoquinas expresado por los linfocitos



(Fuente: Baneth *et al.*, 2008)

12. Diagnóstico

El diagnóstico de Lcan debe ser basado en un enfoque integral, basándose en una anamnesis exhaustiva, que nos ofrezca datos epidemiológicos relevantes como hábitat, tipo de actividad, tiempo de exposición al vector, zona geográfica, procedencia, etc., además de considerar los signos clínicos y el resultado de los exámenes directos e indirectos de laboratorio que se realicen (Castagnaro *et al.*, 2007; Miró, 2007b).

12.1. Patología clínica

Una adecuada interpretación de los resultados de los análisis clínicos permite, en muchos casos, sospechar la existencia de la enfermedad, evaluar el estado general del paciente, ayudar a establecer un pronóstico y vigilar la respuesta al tratamiento (Roura, 2008).

12.1.1. Hemograma

a) Eritrocitos (V.N: $5-8 \times 10^6/\mu\text{l}$)

La disminución en la masa total de eritrocitos circulantes se puede estimar cuantitativamente mediante los índices eritrocíticos, en la Lcan el animal puede estar dentro de los rangos normales, aunque es frecuente la presencia de anemia de ligera a moderada, normocítica, normocrómica (a veces hipocrómica), no regenerativa, es decir, típica de enfermedad crónica, debido a que intervienen mediadores químicos en su presentación que reducen la disponibilidad del hierro debido a mecanismos inflamatorios y disminuyen la eritropoyesis y la vida media de los eritrocitos. Si el paciente desarrolla, además, una insuficiencia renal crónica, la anemia se agrava como consecuencia de la disminución en la síntesis de eritropoyetina (Castagnaro *et al.*, 2007; Roura, 2008).

b) Leucocitos (V.N: $9-12 \times 10^3/\text{ul}$)

El recuento total de leucocitos suele estar de normal a leucocitosis en las fases iniciales de la infección y leucopenia, linfopenia, monocitosis y trombocitopenia en las fases crónicas es decir se muestra un “leucograma de estrés/inflamación”. La monocitosis se observa como consecuencia de la respuesta inflamatoria crónica que se establece (Castagnaro *et al.*, 2007; Miró, 2007b; Roura, 2008).

c) Recuento de Plaquetas (V.N: $200-400 \times 10^3/\text{ul}$)

La trombocitopenia es un hallazgo común, se debe tener en cuenta que el riesgo de hemorragia aparece cuando la trombocitopenia es inferior a 50 000 plaquetas/ μl , en los demás casos las hemorragias pueden deberse a los depósitos de complejos inmunitarios en la pared del endotelio vascular, lo que produce vasculitis y causa defectos en la interacción entre las plaquetas

y el endotelio, otra causa sería procesos inmunomediados por cambios en los receptores de membrana de las plaquetas donde estaría involucrada la IgM e IgE (Roura, 2008).

12.1.2. Panel Bioquímico Sanguíneo

12.1.2.1. Perfil hepático

En estadios iniciales el perfil bioquímico de los perros con enfermedad renal crónica (ERC) secundaria a leishmaniasis suele ser completamente normal (Miró, 2007b).

a) Proteínas Totales (V.N: 5.4-7.1 g/dl)

En fases avanzadas de la enfermedad, la concentración de proteínas totales puede superar los 10 g/dl. El título de anticuerpos se correlaciona con la hiperglobulinemia, asociada a la estimulación antigénica crónica de los linfocitos B, lo que desencadena una respuesta humoral excesiva e inefectiva. El monitoreo de las proteínas séricas por electroforesis es considerado la mejor manera de evaluar la respuesta inicial al tratamiento cuando los valores vuelven a la normalidad; sin embargo en algunos casos esto no se aprecia, por lo que este cociente se debe usar con precaución (Noli, 1999; Martínez y Ceron, 2005).

b) Albúmina (V.N: 2.3-3.2 g/dl)

El descenso de la albúmina en la sangre se atribuye a la pérdida de esta proteína por la orina principalmente. También pueden contribuir a la hipoalbuminemia la anorexia, la diarrea consecuencia de la enterocolitis urémica con la consiguiente mala absorción, y el desvío de la síntesis hepática de albúmina hacia la producción de proteínas propias de la inflamación crónica instaurada (mediadores químicos como la IL-6, disminuyen la síntesis de albúmina) (Zaragoza, 2001).

c) Globulinas (V.N: 2.7-4.4 g/dl)

El incremento de las proteínas totales séricas (hiperproteinemia) se debe a la hiperglobulinemia policlonal. Fundamentalmente de las beta y gamma globulinas. Las β -1 y β -2 aumentan en la fase inicial de la enfermedad, seguidas de las γ -globulinas. La hipergammaglobulinemia está presente en el 80% de los perros enfermos (Noli, 1999; Miró, 2007b; Roura, 2007).

d) Relación Albúmina: Globulina (V.N: 2:1 ó 0.6-1.1)

Hay una inversión de la relación A:G, siendo inferior a 0,5. Este hecho guarda relación con el empeoramiento del estado general del animal (Zaragoza, 2001; Miró, 2007b).

e) Alanin Aminotransferasa (ALT) (V.N: 21-102 UI/L)

Transferasa específica de hígado. Relacionada a enfermedades hepáticas agudas. Se observan elevaciones en los niveles séricos de ALT (Zaragoza, 2001; Miró, 2007b).

f) Fosfatasa Alcalina (ALP) (V.N: 23-66 UI/L)

Hidrolasa de poca especificidad. Relacionada a enfermedades hepáticas crónicas. Se observan elevaciones en los niveles séricos de ALP (Vásquez, 2006; Miró, 2007b).

g) Bilirrubina Total (BT) (V.N: 0.07-0.61 promedio: 0.25 mg/dl)

De normal a hepatopatías. El daño hepático en la leishmaniosis no es frecuente. Probablemente, esto se debe a que rara vez el parásito produce una inflamación aguda y extensa en hígado (Roura, 2007).

h) Colesterol (V.N: 100-200 mg/dl)

Hipercolesterolemia, pero no todos los perros con esta enfermedad presentan un incremento en la concentración plasmática del colesterol que se atribuye a una alteración hepática y a la interacción entre el parásito y el metabolismo lipídico (Castagnaro *et al.*, 2007; Roura, 2008).

12.1.2.2. Perfil Renal

a) Urea (V.N: 10-30 mg/dl)

La urea es el principal producto terminal del catabolismo de las proteínas, es filtrada por los glomérulos, se observa el aumento de sus valores normales, cuando aproximadamente el 70% de las nefronas están afectadas. La uremia se describe como uno de los hallazgos laboratoriales más característicos de la enfermedad (Roura, 2008).

b) Creatinina (V.N: 1-2 mg/dl)

Se forma del metabolismo de la creatinina muscular y la fosfocreatina. Después de haber sido filtrada por los glomérulos se excreta en la orina. Se usa como indicador del ritmo de filtración glomerular. El nivel de urea y de creatinina en sangre tiene un factor pronóstico muy importante, puesto que el desarrollo de una insuficiencia renal crónica avanzada siempre es indicador de mal pronóstico. Esta alteración analítica irá acompañada además de anemia y proteinuria. Igualmente, su determinación contribuirá a elegir el tratamiento más adecuado (de ser posible que no sea nefrotóxico) y evaluar la respuesta terapéutica (Roura, 2008).

12.1.3. Urianálisis

La evaluación renal es importante, ya que en fases avanzadas de la enfermedad puede desarrollarse una insuficiencia renal como consecuencia de glomerulonefritis inmunomediada, nefritis intersticial y en raras ocasiones amiloidosis, es aconsejable la obtención de la muestra por cistocentesis (Zaragoza, 2001; Miró, 2007b).

12.1.3.1. Examen Físico Químico

a) Peso Específico: (V.N: 1.010-1.030): Este parámetro permite valorar la capacidad del riñón para concentrar y diluir la orina. Pues es un factor importante a la hora de determinar el significado de proteinuria, cristaluria y presencia de células en la orina. Se altera en función del estado de hidratación y por enfermedad. La Lcan produce IRC lo que lleva a una disminución de la densidad urinaria (Castagnaro *et al.*, 2007).

b) Color y Aspecto: Color oscuro se asocia a bilirrubinuria y el olor fuerte amoniacal a infecciones oportunistas, el aspecto turbio se asocia al contenido de elementos celulares, eritrocitos o cristales (Castagnaro *et al.*, 2007).

c) Proteinuria: Es el hallazgo más frecuente, puede ser de moderada a grave, y se desarrolla como consecuencia de una glomerulonefritis por depósito de complejos inmunes perdiendo proteínas, la albumina principalmente (Castagnaro *et al.*, 2007; Miró, 2007b).

12.1.3.2. Sedimento

a) Eritrocitos

También es posible encontrar hematuria debido a la necrosis de las células del epitelio de los túbulos, como consecuencia de los inmunocomplejos (Ferrer, 2002; Miró, *et al.*, 2007; Zárate *et al.*, 2007).

b) Cilindros

La proteinuria persistente está asociada a un sedimento de orina normal o con presencia de cilindros hialinos, indicativos de enfermedad tubular activa, debido a que las proteínas que precipitan en los túbulos distales y colectores del riñón, pasan a la orina (Ferrer, 2002; Miró, *et al.*, 2007; Zárate *et al.*, 2007).

12.2. Pruebas parasitológicas

El diagnóstico confirmatorio consiste en la observación directa de los amastigotes en extensiones teñidas de las distintas muestras biológicas o de los promastigotes en el medio de cultivo *in vitro* (MINSa, 1997; Miró, 2007b).

12.2.1. Frotis de lesión

La detección del parásito se puede realizar a partir del aspirado de médula ósea, ganglio linfático, hígado, bazo, sangre y biopsia cutánea. La toma de muestra se puede realizar según los siguientes procedimientos (Miró, 2007b):

a) Punción ganglionar

Para el aspirado de ganglio se utiliza una aguja #21 con jeringa de 10ml, se realiza más frecuentemente del ganglio poplíteo o del preescapular, después de limpieza y desinfección de la zona, el ganglio linfático se mantiene en posición superficial por presión con los dedos, se mueve la aguja varias veces hacia atrás y adelante aspirando el contenido ganglionar (OPS, 1996; Otranto *et al.*, 2004; Saridomichelakis *et al.*, 2005; Miró, 2007b).

b) Punción medular

En el aspirado de médula ósea se utiliza aguja Rosenthal con jeringa de 10ml conteniendo 0.2ml de solución salina estéril, se puede obtener la muestra de la unión condrocostal entre la 5-6^{ta} unión, de la cresta ilíaca o cresta tibial. Tras la tranquilización del animal y desinfección de la zona, se introduce la aguja en el canal medular y se aspira (Martínez y Ceron, 2005; Saridomichelakis *et al.*, 2005; Miró, 2007a, 2007b).

c) Biopsia cutánea

Se puede realizar sobre piel sana o lesionada que tenga un aspecto anormal como pérdida de pelo, decoloración, descamación o asperezas poco frecuentes. La toma de muestra de una lesión hay que realizarla en el borde inflamado, nunca en el centro de la misma. La biopsia se lleva a cabo tras la desinfección de la zona elegida con la ayuda de tijeras o bisturí y se toma una muestra de 3 mm de diámetro. El perro debe estar tranquilizado o anestesiado (0.5mL de lidocaína al 2%) (OPS, 1996; MINSa, 1997; Adamama *et al.*, 2007; Miró, 2007b).

d) Biopsia de hígado y bazo

El aspirado de hígado y bazo puede realizarse con ayuda de un ecógrafo o por palpación de los mismos. Una vez que el perro está tranquilizado o anestesiado, se coloca en decúbito lateral derecho y se desinfecta el flanco izquierdo. Se localiza el bazo y se introduce la aguja adecuada, formando un ángulo de 45° con la línea cráneo caudal del animal, a una distancia entre 1 y 3 cm

del borde ventral de la última costilla (dependiendo del tamaño del animal) en una proyección de esta costilla hacia la línea abdominal media. Después se aspira suavemente el material esplénico. Para la realización de las biopsias esplénicas, hepáticas e incluso renales, también se puede utilizar la técnica de laparoscopia flexible. Sin embargo, estas muestras biológicas no se emplean de forma habitual en la clínica veterinaria ya que requieren mucha práctica debido al riesgo de producir hemorragias durante su extracción (Miró, 2007b).

e) Procesamiento y observación de la muestra

Tras la realización del frotis se deja secar al aire, se fijan con metanol (alcohol metílico) al 100% durante 3 minutos, descartar el alcohol y dejar secar a temperatura ambiente. Se rotulan y se envuelven con papel de manera individual si fuera necesario transportarlas o se tiñen inmediatamente con colorante Giemsa o con el método Diff Quick (MINSA, 1997; Roura, 2007). Se examinan al microscopio utilizando un objetivo de inmersión en aceite con 50 a 100 aumentos y de ser posible de 400, 600 ó 1000x (OPS, 1996; Saridomichelakis *et al*, 2005; OIE, 2008).

Los amastigotes pueden observarse intracelularmente o bien dispersos por el campo al haberse roto los macrófagos. Se debe considerar un resultado positivo, la aparición de una sola célula parasitada, por esto tiene una especificidad 100%, pero su gran problema es que a veces es imposible detectar el parásito, por lo tanto una punción negativa no es excluyente sobre todo en animales en fases iniciales y en pacientes que ya están en tratamiento, depende también de la destreza del examinador para identificar pigmentos naturales como la hemosiderina y precipitados de la tinción que en ocasiones pueden imitar los amastigotes de *Leishmania*. Dada la mayor concentración de parásitos en la médula ósea, se considera un método más sensible, aunque de mayor dificultad que la punción ganglionar, aproximadamente de un 60-75% en médula ósea y de un 30-50% en ganglio linfático, dependiendo de la carga parasitaria asociada a la gravedad del proceso. Los perros sintomáticos pueden presentar sensibilidades de 88.2% en médula ósea y del 94.7% en ganglio linfático (Noli, 1999; Gradoni, 2002; Saridomichelakis *et al*, 2005; Miró, 2007a, 2007b; Roura, 2007).

12.2.2. Aislamiento en medios de cultivo

Cuando se intenta el aislamiento primario de organismos desconocidos, se debe utilizar un medio bifásico con agar sangre, de preferencia el medio NNN (Novy, Nicolle y McNeil), también son aceptados: medio líquido *Drosophila* Schneider, medio sólido de infusión de cerebro y corazón (BHI) o medio EMTM (medio de Tobie modificado por Evans) (OIE, 2008). En la adición de antibióticos para prevenir la contaminación puede usarse ampicilina y estreptomicina a 250 µg/mL y 100 UI respectivamente; penicilina y estreptomicina a 500 UI y 500 ug/mL respectivamente, penicilina y estreptomicina a 500 UI y 1 mg respectivamente ó 50 µg/ml de Kanamicina (OPS, 1997, MINSA, 2000; Montalvo *et al.*, 2001; Orué *et al.*, 2008).

Habitualmente se siembran unos 50 µl de la muestra biológica y si partimos de una biopsia sólida, ésta debe ser previamente disgregada. Los tubos se mantienen en estufa a una temperatura que varía entre 22-26°C y se monitorea cada 48 horas tomando una gota del sobrenadante extraído asépticamente de cada tubo, para observar el crecimiento de parásitos con objetivo 10x o la presencia de contaminantes, el cultivo contaminado es descartado. Si los cultivos no están contaminados con bacterias u hongos, al examinarlos al microscopio a partir de los 7 días pueden encontrarse promastigotes que nadan libremente, aunque pueden requerirse resiembras semanales a medio fresco antes de que se consiga el aislamiento de los parásitos. Se considera que un cultivo es negativo, sino se observan promastigotes después de cuatro pases sucesivos (OPS, 1996; Nimrin *et al.*, 2002; Miró, 2007b).

Esta técnica diagnóstica incrementa la sensibilidad de la microscopía casi un 20%, pero la dificultad de disponer de un buen medio, la tardanza en obtener el resultado y la posibilidad de contaminaciones hace que se reserve para laboratorios especializados (Miró, 2007b).

12.2.3. Aislamiento en animales de laboratorio

La inoculación en animales de experimentación es de gran utilidad para aislar cepas de *Leishmania* de difícil crecimiento o a partir de inóculos contaminados. El modelo *in vivo* más utilizado es el hámster (*Mesocricetus auratus*). El material aspirado se diluye en 2 ml de solución salina fisiológica estéril y se inocula en los hámsteres (Miró, 2007b; Zárate *et al.*, 2007). En caso de detectar parásitos dermatotrópicos, las suspensiones de tejidos o los aspirados se inoculan intradérmicamente en la nariz y/o en la almohadilla plantar de una pata posterior. Cuando se sospecha que el material está infectado con parásitos que causan LV, se debe hacer la inoculación preferiblemente por la ruta intraperitoneal. La infección cutánea se hace aparente semanas o meses después por el desarrollo de un nódulo o úlcera en el sitio de la inoculación, y en el caso de parásitos viscerotrópicos se evidencian meses después por la infección masiva de los órganos internos. El examen de frotis de suspensiones de tejidos/aspirados de hámster mostrará amastigotes con tinción de Giemsa. Si el animal permaneciera negativo, se necropsia a las 52 semanas para realizar el cultivo de muestras de hígado y bazo (MINSA, 1997; Marco *et al.*, 2005; OMS, 2008).

Las ventajas y desventajas del aislamiento en medios de cultivo y el aislamiento en animales de laboratorio son:

Los medios de cultivo son positivos en **5 a 30 días** en comparación con los **meses** que tardan las lesiones en aparecer en un animal. Sin embargo, la desventaja del aislamiento en medios de cultivo es que la toma de muestra debe realizarse con la mayor asepsia posible y la siembra debe llevarse a cabo en condiciones estériles estrictas; por tanto, no es siempre realizable

en condiciones de campo, lo que hace que su utilización se limite más al uso para la identificación isoenzimática (Roura, 2007; OIE, 2008).

12.2.4. Histopatología

A partir de la muestra con una pinza presionar el trocito de tejido sobre una lámina para obtener una impronta, un frotis o luego de triturar la biopsia más 0.5ml de solución salina con antibióticos, se pueden utilizar en cultivos (MINSA, 1997; OPS, 1996). La histopatología de los diversos órganos se realiza fijando las muestras en formalina al 10%, se realizan cortes en dirección al hilio de cada órgano para que la solución conservadora penetre bien en los tejidos, luego cada órgano debe ser embebido en parafina. Posteriormente se realizan cortes de 4–5 μm y se tiñen con hematoxilina y eosina (HE) (Coura *et al.*, 2006; Adamama *et al.*, 2007; Castagnaro *et al.*, 2007; Zárate *et al.*, 2007).

Muchas veces hay una gran cantidad de parásitos y el diagnóstico es sencillo, pero otras veces no es posible visualizar ningún organismo. En las lesiones más recientes pueden encontrar los parásitos más fácilmente. Las técnicas inmunohistoquímicas (inmunoperoxidasa o inmunofluorescencia directa) aumentan la sensibilidad, pues facilitan la observación del parásito por tinción específica del mismo. Las limitaciones son que no todos los pacientes presentan lesiones cutáneas y si el número de organismos en la piel es muy bajo pueden obtenerse falsos negativos (Roura, 2007).

12.2.5. Xenodiagnóstico

El xenodiagnóstico es una técnica para la detección y el aislamiento de un agente patógeno usando su vector artrópodo natural. Aunque no es una técnica diagnóstica de rutina, debido a que los flebótomos no están disponibles fácilmente, ha sido empleada para evaluar la infectividad de cepas de *Leishmania*, así como la capacidad infectiva de perros enfermos y tratados con diferentes fármacos. *Lu. longipalpis* es la especie que se llega a colonizar con más facilidad en el laboratorio (Gradoni, 2002; Lainson y Rangel, 2005; Miró, 2007b).

La técnica del xenodiagnóstico indirecto es más viable porque se usan flebótomos que se alimenten artificialmente de muestras de sangre periférica. El xenodiagnóstico directo requiere que el vector criado en el laboratorio se alimente sobre perros sospechosos sedados o sobre animales de experimentación anestesiados durante una hora aproximadamente (Gradoni, 2002; Nieves y Pimenta, 2002; Miró, 2007b).

Una vez verificada la alimentación por el volumen aumentado y la tonalidad rojiza del abdomen de las hembras del flebótomo, se las alimenta con un trozo de algodón embebido en una solución acuosa de miel y azúcar ó solución de sucrosa al 50%, en un ambiente de penumbra, 95% humedad relativa y temperatura de 21-25°C. Entre el primero y el décimo día después de la alimentación con sangre, se disecan las hembras. Se observa el tracto digestivo para verificar la

presencia de flagelados con microscopio óptico (40X). Este material se puede utilizar para frotis, cultivo y PCR. Este método es muy sensible, pero no es práctico (Rosa *et al.*, 2001; Nieves y Pimenta, 2002; Castagnaro *et al.*, 2007).

12.3. Pruebas serológicas

Nos permiten detectar la presencia de anticuerpos anti-*Leishmania* en el suero de pacientes. La respuesta humoral normalmente es muy alta y los perros producen gran cantidad de anticuerpos principalmente IgG (IgG1 e IgG2). La presencia de un positivo en estas pruebas, no indica la presencia de infección activa, pues puede haber anticuerpos en algunos individuos sanos como en un falso positivo (reacción cruzada) o después de la curación (Davies *et al.*, 2003; Roura, 2007).

La seroconversión ocurre en algunos meses desde la infección, en promedio 5 meses (rango: 1-22) para las infecciones naturales y 3 meses (rango: 1-6) para las experimentales (Castagnaro *et al.*, 2007).

Cuando los títulos son altos, las posibilidades de falsos positivos disminuyen, pero siempre dependiendo de los límites establecidos para cada técnica. En los animales que dan titulaciones positivas débiles o muy cerca de los límites es preferible repetir la prueba aproximadamente al mes para determinar si se trataba de un título residual que va decreciendo o de una infección activa en progreso. En zonas endémicas es muy frecuente encontrar animales seropositivos sin infección activa y al contrario, a veces en fases iniciales es posible encontrar animales seronegativos. Hay muchos animales en los que los títulos disminuyen rápidamente durante el tratamiento, pero en cambio en otros son oscilantes o se mantienen elevados incluso sin signos clínicos. Por estas razones las técnicas serológicas resultan una herramienta muy útil en el diagnóstico de la Lcan, pero de limitado valor a la hora de evaluar la presencia de parásitos en el paciente durante la respuesta al tratamiento (Roura, 2007).

Las fuentes de antígeno más común son los amastigotes de cortes congelados, frotis de órganos infectados o los promastigotes cultivados. El antígeno recombinante rK39 es una secuencia peptídica repetitiva de 39 aminoácidos del carbono terminal de una proteína relacionada a la familia de las kinesinas de *Leishmania chagasi*, tiene como ventajas que se produce a bajos costos y no produce reacciones cruzadas lográndose incrementar la especificidad. Al utilizarse como prueba cualitativa ofrece la posibilidad de coleccionar muchas muestras en condiciones de campo, no necesita un laboratorio equipado ni personal especializado y al observar los resultados se pueden comunicar de inmediato (Otranto *et al.*, 2004; Schallig *et al.*, 2004; Mettler *et al.*, 2005).

Se han observado reacciones cruzadas en perros infectados con *Babesia canis*, *Toxoplasma gondii*, *Neospora caninum*, *Hepatozoon canis*, *Ehrlichia sp.*, y *T. cruzi*, cuando se usan promastigotes o amastigotes como antígenos, esto se pueden evitar usando antígenos específicos recombinantes de *Leishmania* (Mettler *et al.*, 2005; Wardrop *et al.*, 2005).

12.3.1. Prueba de Inmuno Fluorescencia Indirecta (IFI)

Es considerada la técnica serológica de referencia por la OIE. La sensibilidad llega al 90 a 92% en perros sintomáticos, hasta apenas a 29.4 a 73% en animales asintomáticos (Mettler *et al.*, 2005; Castagnaro *et al.*, 2007; Miró, 2007b).

Cuando se utiliza como antígeno a los promastigotes se fijan con acetona fría a la lámina portaobjeto, sobre el que se colocarán diferentes diluciones de los sueros a evaluar. La reacción antígeno-anticuerpo es visualizada por la adición de una inmunoglobulina marcada con isotiocianato de fluoresceína, dando lugar a una reacción fosforescente color verde manzana, a través de un microscopio de inmunofluorescencia con iluminación UV apropiada (MINSA, 1997). El título de corte estándar es 1/40, por lo que aquellos sueros que presenten fluorescencia a esa dilución o superior se consideran positivos. Cuando el resultado es dudoso se recomienda realizar un nuevo análisis transcurridos 45 a 60 días para comprobar si se ha producido seroconversión (Medina, 2002; Miró, 2007b; OIE, 2008).

12.3.2. Técnica de Inmunoabsorción Enzimática (ELISA)

Es una prueba que nos permite detectar y cuantificar antígenos o anticuerpos en fluidos biológicos. Su principal ventaja es la automatización, que permite procesar un gran número de muestras simultáneamente. El antígeno a usarse es fijado (absorbido) a una superficie sólida apropiada (placa de poliestireno), el cual será reconocido por el anticuerpo primario en el suero a evaluarse. Para visualizar la reacción del complejo antígeno-anticuerpo, se requiere adicionar un sustrato no cromático, el peróxido de hidrógeno, el cual, por acción de la enzima peroxidasa, es transformado en un producto coloreado y soluble. La enzima a usarse debe ser estable, presentar alta actividad específica y ser de fácil unión covalente al antígeno o al anticuerpo. La formación del complejo antígeno-anticuerpo específico da lugar a un producto coloreado y soluble, el cual, puede ser interpretado de manera cualitativa o cuantitativa (MINSA, 1997; Miró, 2007b).

Se han utilizado diversos antígenos que van desde antígenos crudos, como el antígeno del promastigote soluble en detergente de Tritón X-100, hasta proteínas recombinantes como el antígeno rK39 que reporta una sensibilidad y especificidad de 92 a 100% en animales sintomáticos y del 66 a 92.4% en perros asintomáticos. Es necesario su validación y estandarización en cada laboratorio y área endémica, así como su evaluación con sueros de pacientes en diferentes periodos clínicos, debido a que los títulos de anticuerpos pueden variar (Mettler *et al.*, 2005; Cannova *et al.*, 2007b; Miró, 2007b; OIE, 2008).

Figura 29. ELISA empleando el antígeno rK39

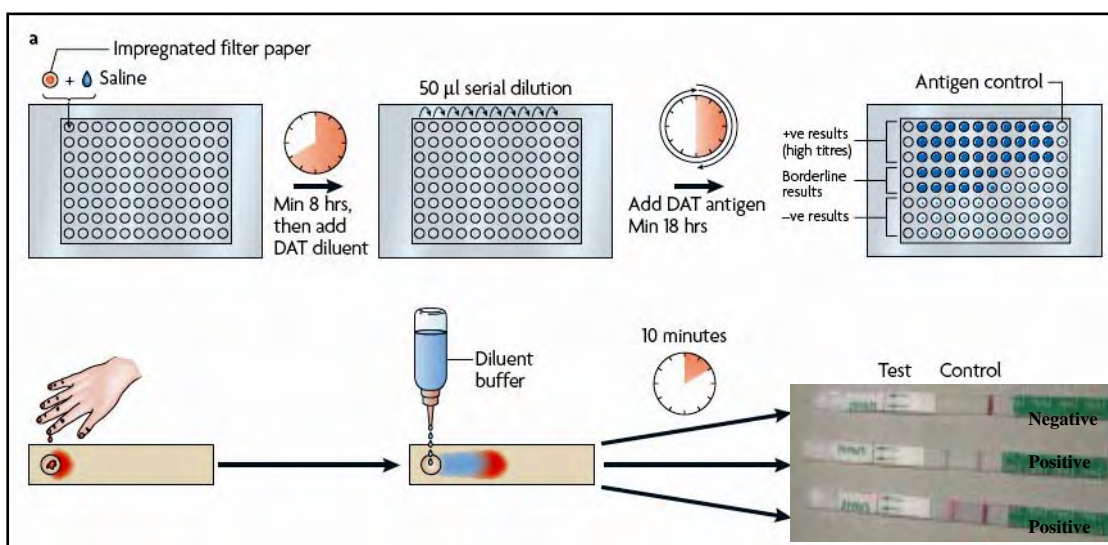


(Fuente: Duo Leish/Ehrli, 2008; IDEXX, 2008)

12.3.3. Prueba Inmunocromatográficas

Las pruebas inmunocromatográficas rápidas o dipsticks se han desarrollado utilizando fundamentalmente el antígeno recombinante rK39 y muestran una sensibilidad del 96% y especificidad del 100% en perros positivos por parasitología, tanto sintomáticos como asintomáticos, mientras que otros autores reportan una sensibilidad del 100% en perros sintomáticos y sólo 76.5% en asintomáticos. La fácil realización hace que sea adecuada para estudios de campo, no presentan reacciones cruzadas con otras parasitosis, además vienen listas para usar, en empaque individual y se pueden leer rápidamente (Schallig *et al.*, 2004; Otranto *et al.*, 2004, 2005; Mettler *et al.*, 2005).

**Figura 30. Prueba de Aglutinación Directa 30a) y
Test rK39 inmunocromatografía 30b)**



(Fuente: Chappuis *et al.*, 2007; Davies *et al.*, 2003)

12.4. Prueba de Hipersensibilidad Retardada o Intradermorreacción de Montenegro (IDR)

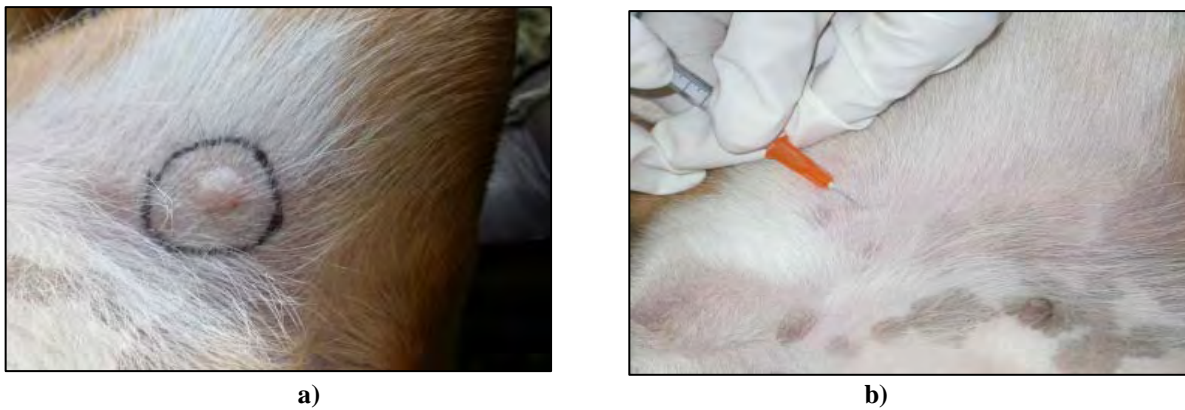
Utilizada desde 1926 por João Montenegro. Mide la reacción de hipersensibilidad retardada de tipo IV, que evidencia la infección por *Leishmania*. Existe una reacción cruzada completa entre todas las especies de *Leishmania*, aunque a menudo los antígenos heterólogos dan una reacción menor, pero esto puede estar originado por dificultades de estandarización. La “leishmanina” es una suspensión de promastigotes muertos y completos ($0.5-1 \times 10^7/\text{ml}$), o desintegrados ($250 \mu\text{g}$ de proteína/ml) en una solución salina libre de pirógenos que contiene fenol. Para que sea positiva en el perro se requiere la inoculación de 10^8 promastigotes o $200 \mu\text{g}$ de proteínas/ml (OPS, 1996; Alvar, 2001; Medina, 2002; OIE, 2008).

Es utilizada en los estudios epidemiológicos para establecer el porcentaje de población que ha entrado en contacto con el parásito. La ausencia de un antígeno (leishmanina) estandarizado apropiadamente, limita la utilidad epidemiológica de esta prueba. Debe ser almacenado entre 2 a 8 °C (Minaya *et al.*, 1999; MINSA, 2000).

12.4.1. Aplicación y lectura

Para aplicarla se rasura una zona de la piel de la cara interna del muslo, se desinfecta con alcohol y se inocula por vía intradérmica, se valora la posible induración, a las 48-72 horas en los perros considerados “resistentes” con una respuesta Th1 eficaz. Para la lectura se delimita el área de la reacción utilizando un bolígrafo y trazando sobre la piel, desde uno de los extremos hacia el punto de inoculación, avanzando hasta encontrar resistencia. Repetir siguiendo los cuatro cuadrantes. Puede tomarse la impresión en tinta aplicando un trozo de banda adhesiva, la banda con la marca en tinta permite tener un registro permanente de cada paciente. Medir el diámetro de la pápula con una regla graduada en mm, si es superior a los 5 mm se considera positiva (OPS, 1996; MINSA, 1997; Medina, 2002; Miró, 2007a, 2007b).

Figura 31. Aplicación 31a) y lectura 31b) de la leishmanina



(Fuente: Ferrer, 2009)

12.4.2. Interpretación de los resultados

a) Perros asintomáticos resistentes caracterizados por tener una serología baja o nula: IDR positiva

Estos animales estuvieron en algún momento de su vida en contacto con el parásito. No tiene leishmaniasis activa. La IDR detecta perros con enfermedad activa que tienen una respuesta Th1 eficaz con más de 4 semanas de evolución. La sensibilidad de las pruebas serológicas y parasitológicas es baja (Saridomichelakis *et al*, 2005; Miró, 2007a).

b) Perros asintomáticos con títulos de anticuerpos altos, bajos o negativos: IDR negativa

Generalmente oscilantes y en los que se observan con poca facilidad parásitos de ganglios o médula, terminarán desarrollando la enfermedad tras el periodo de pre patencia (Saridomichelakis *et al*, 2005).

c) Perros sintomáticos con serología fuertemente positiva: IDR negativa

Los perros sintomáticos tienen una carga alta de parásitos en el hígado y bazo en comparación con los asintomáticos, por lo que el 90–95% de los diagnósticos se realizan sin mayor dificultad, pues existe sintomatología, positividad del examen parasitológico de médula ósea y ganglio linfático y positividad en el examen serológico (Alvar, 2001; Sanchez *et al.*, 2004).

Los perros afectados tienen una respuesta mediada por células deprimida, lo que reduce la respuesta a la leishmanina (Ferrer, 2002; Roura, 2007).

d) Perros sintomáticos con serología dudosa o negativa: IDR negativa

En un 5% de todos los casos, siendo necesario ajustar la técnica diagnóstica o se debe a un déficit de respuesta humoral. En humanos se han obtenido reacciones negativas en pacientes con enfermedades como paludismo, tuberculosis pulmonar, lepra, blastomycosis, sífilis, reumatismo crónico, esporotricosis. Una segunda muestra de suero y el aislamiento del parásito clarifican el proceso (Alvar, 2001; Minaya *et al.*, 2002).

e) Si el perro no está infectado: IDR positiva (falsos positivos)

Presentan una titulación baja por posible reacción cruzada con otras enfermedades (ehrlichiosis o babesiosis) o porque hubieran entrado en contacto con el parásito sin que la infección consiguiera progresar, un segundo suero o la aplicación de otra técnica diagnóstica puede aclarar el caso (Alvar, 2001).

Además debido a la estrecha relación taxonómica que muestran *Leishmania* y *Trypanosoma*, se han encontrado reacciones positivas a la leishmanina en pacientes positivos a *T. cruzi*. En humanos la leishmanina tiene una especificidad de 95 %, en áreas geográficas donde ambos parásitos están presentes (Minaya *et al.*, 2002; MINSA, 2005a).

12.5. Identificación de las diferentes especies de *Leishmania* spp.

No existen criterios morfológicos que permitan distinguir las diferentes especies de *Leishmania*, ni a la observación microscópica convencional de los tejidos parasitados o de los cultivos, ni mediante el estudio de microscopia electrónica (Acha y Szyfres, 2003). Por ello, se han propuesto los siguientes criterios de identificación:

12.5.1. Métodos extrínsecos

Hacen referencia a características externas del parásito como a la sintomatología, distribución geográfica, comportamiento en vectores o animales de laboratorio, el vicerotropismo o dermatropismo y el desarrollo experimental de los promastigotes en las diferentes porciones del tubo digestivo de los vectores (Niederwieser, 2004; Borda, 2005).

Tabla 2. Métodos extrínsecos para identificar especies de *Leishmania*

Características:	Subgénero <i>Leishmania</i>	Subgénero <i>Viannia</i>
Localización en tubo digestivo del vector	Segmento anterior al píloro es decir próximas a la probóscide, <i>Suprasyllaria</i> (Alvar, 2001).	Segmento del píloro y por detrás del mismo, <i>Peripylaria</i> (Alvar, 2001).
Desarrollo en medios de cultivo	Son parásitos de crecimiento rápido en medios de cultivo y de desarrollo abundante (OPS, 1996).	Son parásitos e crecimiento lento en medios de cultivo y de desarrollo escaso o moderado (OPS, 1996).
Patogenicidad del agente para la piel del hámster	Se reproducen con rapidez y forman histiocitomas en los que abundan los amastigotes, las metástasis son frecuentes (Acha y Szyfres, 2003).	Se multiplican muy lentamente (6 ó más meses), en la piel del hámster produciendo pequeños nódulos o úlceras con escasos amastigotes que no producen metástasis (Acha y Szyfres, 2003).

Figura 32. Lesiones metastásicas en *Mesocricetus auratus*



(Fuente: Miranda *et al.*, 2006)

Sin embargo, la variación producida por estos criterios llevó a la búsqueda de otros más uniformes, desarrollándose métodos bioquímicos, inmunológicos y moleculares que permiten obtener marcadores taxonómicos más precisos que se basan en las características intrínsecas de estos parásitos (Doménica, 2007).

12.5.2. Métodos intrínsecos

12.5.2.1. Técnicas de caracterización fenotípica

Se incluyen las dos técnicas bioquímicas más utilizadas:

a) Caracterización de isoenzimas: zimodemos

Son las poblaciones que se distinguen por la composición de sus isoenzimas. Es la técnica de referencia para identificación de especies. Requiere un gran número de parásitos (5×10^9 – 1×10^{10}) (Acha y Szyfres, 2003; OIE, 2008).

Fundamento

A los promastigotes aislados mediante cultivos se les extrae las enzimas solubles, estas moléculas proteicas sirven a las células para catalizar las reacciones del metabolismo, admitiéndose para una misma función ligeras alteraciones estructurales en la molécula de la enzima (isoenzima). Estas diferencias están representadas en la secuencia de ADN y por tanto en su expresión proteica. La caracterización de isoenzimas se realiza mediante el estudio de la movilidad electroforética (método de separación de sustancias cargadas al aplicar un campo eléctrico, cada molécula se mueve hacia el electrodo de carga opuesta y posteriormente la visualización que es posible con la tinción apropiada). Ello permite la caracterización de éstas, según sus perfiles enzimáticos, en grupos taxonómicos electroforéticamente homogéneos llamados “zimodemos”, la matriz (acetato de celulosa) con el conjunto de bandas de isoenzimas teñidas se denomina “zimograma”. Los parásitos de una especie que poseen los mismos perfiles enzimáticos pertenecen a un único zimodemo, es decir serán clasificados en un zimograma idéntico (Marco *et al.*, 2005; Cannova, 2007a).

Los zimodemos identificados se designan con números. Por ejemplo: MON-1, MON-11, MON-27, MON-77, MON-98, MON-105, MON-108, MON-103, MON-113.

Las cepas de especies de *Leishmania* que se usan para preparar productos biológicos deben identificarse a nivel de especie y sub especie, luego se les debe asignar un Código Internacional que consta de cuatro elementos separados por barras oblicuas:

- (a)** De hospedador del que la cepa se aísla (M para mamíferos e I para insectos, seguido de tres letras que indican el nombre genérico del hospedador).
- (b)** El país donde se aísla, indicado por un código de dos letras.

(c) El año del aislamiento indicado por los dos últimos dígitos.

(d) El código original del laboratorio del aislamiento

Por ejemplo: MHOM/IN/80/DD8, MHOM/BR/75/M2903, MHOM/BR/74/PP75, IFLA/BR/67/PH8. Las cepas estándar están disponibles previa petición a los Centros Colaboradores de la Organización Mundial de la Salud en Londres, Reino Unido, Montpellier, Francia y Jerusalén, Israel para que los perfiles enzimáticos de los aislados sean comparados con los de referencia (Borda, 2005; OIE, 2008).

Los sistemas enzimáticos más analizados son alanin aminotransferasa (ALAT), aspartato aminotransferasa (ASAT), fosfoglucomutasa (PGM), glucosa fosfato isomerasa (GPI), glucosa-6-fosfato deshidrogenasa (G6PDH), malato dehidrogenasa (MDH), malic enzima (ME), manosa fosfato isomerasa (MPI), nucleosidasa hidrolasa (inosine) (NHi1 y NHi2) y piruvato kinasa (PK) (Marco *et al.*, 2005; Madeira *et al.*, 2006).

Aportes (Cannova, 2007a):

- Se demostró que la clasificación propuesta por Lainson & Shaw, de subgénero *Viannia* y *Leishmania* representa un esquema válido.
- No se encontraron diferencias entre *L. chagasi* y *L. infantum*, lo que sugiere que se trataría de una especie importada.
- Las especies del subgénero *Viannia* son un grupo originario del Nuevo Mundo.
- Ha hecho posible evaluar el papel de reservorios y vectores.
- Se ha podido diferenciar las especies de *L. amazonensis*, *L. braziliensis* y *L. guyanensis*.
- Gran número de muestras de *Leishmania* del Nuevo Mundo se evaluaron mediante este método, logrando agruparlas en 68 zimodemos.

Limitaciones

Requiere el cultivo de un gran número de parásitos, los aislados se pueden contaminar fácilmente. En una infección mixta solo el parásito que crezca más rápido será identificado. Es muy laborioso, demanda mucho tiempo y requiere altos costos para su realización lo que hace poco factible el estudio a gran escala (Cannova, 2007a; Oshaghi *et al.*, 2008).

b) Anticuerpos monoclonales

Se aplica al análisis y clasificación de especies y subespecies de *Leishmania*. Para la producción de anticuerpos, se inmunizan ratones BALB/c con preparaciones de membranas de promastigotes o amastigotes. Después se seleccionan y se clonan por diluciones limitantes los cultivos de hibridoma que secretan anticuerpo. La especificidad para las cepas de *Leishmania* se determina por inmunofluorescencia o por pruebas inmunoradiométricas. Estos análisis deben ser cuantitativos, pues la cantidad de un mismo antígeno superficial puede variar entre distintas

especies de *Leishmania*. Se han utilizado también anticuerpos monoclonales en técnicas inmunohistoquímicas con aplicación a los tejidos de las biopsias. El uso de anticuerpos monoclonales contra antígenos específicos de *Leishmania* permite identificar amastigotes en frotis y biopsias, o promastigotes en cultivos (OIE, 2008).

12.5.2.2. Técnicas de caracterización genotípica

Estas técnicas tienen varias ventajas, pues actúan sobre un material que permanece invariable a lo largo de la vida del parásito, el ADN, el cual es independiente de los cambios morfológicos del protozoo a lo largo de su ciclo biológico, es independiente de la respuesta inmune de los pacientes y se puede detectar en las infecciones activas, oligosintomáticas o asintomáticas (Alvar, 2001).

Los métodos disponibles se basan en la posibilidad de cortar fragmentos de ADN mediante enzimas de restricción en lugares conocidos de la secuencia. La capacidad de separar las dos hebras de ADN por calor, dejando expuestas cada una de ellas a la manipulación con sondas. La facilidad de hibridar una hebra de ADN de una cepa problema con una especie conocida; en caso de que ambas sean complementarias se produce hibridación, lo que indica que el ADN molde y la sonda pertenecen a la misma especie. La posibilidad de construir una hebra de ADN sobre su molde complementario, en presencia de iniciadores de la reacción, enzima polimerizador y nucleótidos (Alvar, 2001).

En función de estas propiedades, las técnicas de caracterización genotípicas son:

a) Hibridación con sondas de ADN

Se basan en la gran especificidad de la interacción entre las bases complementarias. Para que la hibridación permita identificar en un genoma se requiere dos elementos básicos:

- De un aislado de *Leishmania* desconocido se obtiene generalmente con enzimas de restricción una muestra de ácido nucleico, a esta secuencia se le llama “diana”. Son muy utilizadas como secuencia dianas los minicírculos del ADN del kinetoplasto (ADNk), por presentar secuencias conservadas y repetidas.
- De cepas estándar bien caracterizadas se obtienen secuencias marcadas (radiactivas, coloreadas, fluorescentes) del ADN nuclear o del kinetoplasto y de una sola cadena, a este fragmento corto de ácido nucleico se le llama “sonda” (Cannova, 2007a; OIE, 2008).

Fundamento

Se basa en la mezcla sencilla de ácidos nucleicos: “diana” y “sonda” bajo condiciones experimentales que permitan que sólo las secuencias de ADN complementario formen ADN de cadena doble, que se puede detectar por la sonda marcada radiactivamente o por reacción

inmunoenzimática. La hibridación nos indica que el ADN molde y la sonda pertenecen a la misma especie (Cannova, 2007a).

Estas técnicas son lo suficientemente sensibles como para identificar 10^2 – 10^3 organismos. Se necesitan muchos menos parásitos (<10) para la identificación por la técnica de hibridación *in situ* (OIE, 2008).

Aportes (Cannova, 2007a):

- Se ha separado *L. braziliensis* de *L. mexicana*, lográndose incluir dentro del subgénero *Viannia* las especies *L. braziliensis*, *L. guyanensis* y *L. panamensis*.
- *L. peruviana* queda clasificada dentro del subgénero *Viannia*.
- Insistió en la necesidad de reclasificar *L. colombiensis* y *L. equatoriensis* al no ser reconocidas, como había sido sugerido por caracterización isoenzimática.

b) Análisis del polimorfismo en el tamaño de los fragmentos de restricción (RFLP): Esquizodemos

Fundamento

Cuando las enzimas de restricción (endonucleasas) leen una secuencia de ADNk, reconocen su secuencia complementaria (generalmente 4 a 6 nucleótidos), y la cortan en tantos fragmentos como puntos de corte encuentren, mediante hidrólisis de un enlace fosfodiéster se obtienen fragmentos que mediante electroforesis en geles de agarosa se obtiene un patrón electroforético que muestra bandas que parecen las huellas dactilares y son conocidos como “huellas” de restricción. La identificación y clasificación de las cepas de *Leishmania* en “esquizodemos” agrupa a poblaciones que tienen secuencias similares en el ADNk, según la cantidad de bandas que puede aparecer entre las especies e incluso dentro de la misma especie lo que indica la proximidad o lejanía filogenética (Alvar, 2001; Acha y Szyfres, 2003; Cannova, 2007a; OIE, 2008).

Esta técnica también requiere un gran número de parásitos (1×10^{10}) (OIE, 2008).

Aportes (Cannova, 2007a):

- A través de zimodemos y esquizodemos se identificó que *L. braziliensis braziliensis* circulaba tanto en la población humana como en la canina.

c) Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

Esta técnica tiene por objetivo la detección de una secuencia específica de nucleótidos del ADN parasitario y su amplificación *in vitro* (Coura *et al.*, 2006).

Como regla general, el uso de material fresco o congelado es siempre aconsejable, también se puede usar fijado en alcohol etílico al 95%. Muestras fijadas en formalina y parafina son menos recomendables, pero pueden usarse (Castagnaro *et al.*, 2007).

La sensibilidad y especificidad de la PCR depende de los iniciadores utilizados, del número de copias de la diana, del método de extracción, del material de biopsia y del protocolo utilizado. La sensibilidad poco después de la infección es de (88%) y va decayendo después (50%) (OIE, 2008).

Tiene la ventaja de que no es necesario purificar previamente la muestra original por lo que se puede utilizar muchas muestras biológicas, en orden decreciente de sensibilidad: médula ósea y ganglio linfático (entre 86 y 100%), piel (entre 80 y 95%), conjuntiva, sangre periférica. Además también se puede detectar el parásito en cultivo, incluso a partir del intestino de *Lutzomyia*, que se puede detectar aún estando en cantidades exiguas (en algunos casos se pueden detectar 0,1 fentogramo, que equivale hasta un sólo parásito) (MINSA, 2005b; Castagnaro *et al.*, 2007; Roura, 2007).

Fundamento

Se basa en la repetición de los siguientes procesos:

Desnaturalización térmica del DNA mediante digestión del material con la enzima polimerasa termoestable, generalmente es usada la *Taq* polimerasa (de las bacterias *Thermus aquaticus* y *Thermus thermophilus*, capaces de soportar temperaturas superiores a 80°C sin perder su actividad) y extracción de ADN (Cannova, 2007a).

Hibridación de “cebadores” o “primers” (oligonucleótidos de cadena simple) que se unen específicamente al ADN que flanquea una región de interés o secuencia “diana”. Algunos de estos cebadores son especie específicos y otros, en cambio, amplifican fragmentos de ADN común a todas las especies de *Leishmania* (Miró, 2007b; Roura, 2007).

Replicación de la hebra sencilla por una ADN polimerasa termo resistente que cataliza el proceso de síntesis de la secuencia complementaria de nucleótidos, al repetir estos ciclos de desnaturalización y elongación 20–30 veces, se logra amplificar la secuencia diana hasta obtener millones de copias de la secuencia de ADN original (Cannova, 2007a).

El producto de PCR puede visualizarse mediante electroforesis en gel de agarosa teñido con bromuro de etidio (Miró, 2007b; OIE, 2008).

Aportes (Cannova, 2007a):

- Caracterización de las distintas especies de *Leishmania*.

- En *Leishmania* se han desarrollado marcadores específicos y se encontró polimorfismo entre las especies.
- Se ha podido relacionar el polimorfismo de estas secuencias con el área geográfica de procedencia y detectar infección natural en el vector.

d) Variantes de la PCR

Diferentes técnicas son descritas para mejorar la sensibilidad y especificidad del método, como:

PCR-Nested (anidada)

Es una modificación de la PCR tradicional, más sensible pero menos específica, porque incrementa el número de pasajes para prevenir el riesgo de contaminación del DNA extraño. Se busca amplificar con cebadores específicos para las regiones intergénicas de gen de la subunidad pequeña del ARNr, en una primera PCR, pero se aumenta su especificidad al realizar una segunda PCR para amplificar el producto de la primera PCR con cebadores internos de esta región, esto se ha hecho para identificar y clasificar *L. infantum* además de permitir realizar diagnóstico precozmente (Cannova, 2007a; Castagnaro *et al.*, 2007).

PCR-RAPD

Tiene la ventaja de no requerir conocimiento de la región que se desea amplificar, sencillamente se diseñan primers cortos (10-12 pb) de manera aleatoria; los patrones de banda han sido muy útiles en la identificación de la variedad inter e intra especie, demostrándose su polimorfismo. Esta técnica es ampliamente utilizada en taxonomía por su rapidez y no requerir el diseño de iniciadores a partir de secuencias conocidas (Cannova, 2007a).

PCR-RFLP

Consiste en la digestión de los productos de amplificación, con una o más enzimas de restricción y el posterior análisis del polimorfismo de la longitud de los fragmentos obtenidos, se ha utilizado para la identificación de especies y genotipos de *Leishmania* a partir de muestras biológicas (Miró, 2007b).

Real-Time PCR

Permite el continuo monitoreo de la acumulación de productos de PCR durante la amplificación, de este modo es posible identificar el ciclo en el que el producto de PCR se genera de manera logarítmica y por lo tanto se puede inferir la cuantificación del ADN diana presente al comienzo de la reacción, es más sensible que el PCR tradicional (Cannova, 2007a; Miró, 2007b).

12.6. Diagnóstico diferencial

Son muchas las patologías tanto cutáneas como sistémicas que cursan con signos clínicos similares a los mencionados en el cuadro clínico de leishmaniosis, debemos reconsiderar el diagnóstico como única etiología y considerar la posibilidad de patologías concomitantes cuando la evolución es desfavorable o hay una mejoría incompleta (Miró, 2007b).

Ehrlichia canis

Cursa con trombocitopenia y ligera leucopenia seguida de leucocitosis con monocitosis en la fase aguda y severa leucopenia a pancitopenia en la fase crónica, también infecta a las células mononucleares, el estudio de médula ósea es fundamental (Roura, 2006; Breitschwerdt, 2007). También presenta signos oculares donde mecanismos inmunomediados (vasculitis) y/o hemorragias debido a la trombocitopenia, gammapatía monoclonal están implicados en la inflamación intraocular (Komnenou y Koutinas, 2007).

Dirofilaria immitis

Es el nematodo que en algunos lugares se reporta como el agente que produce daño ocular con más frecuencia en el perro. Después de la migración, la larva estadio 4 puede ingresar al ojo desde el espacio subconjuntival, donde se transforman en 5. La patogénesis es asociada a los metabolitos tóxicos que produce el parásito, al daño mecánico directo y a las reacciones inmunológicas. La uveítis anterior es caracterizada por blefarospasmos, hiperemia conjuntival, edema de cornea, anisocoria, además hay blefaritis, descarga purulenta, opacidad corneal, fotofobia, glaucoma secundario. Es posible la visualización del parásito en la cámara anterior (Komnenou y Koutinas, 2007).

Toxocara canis

Involucra en su desarrollo la localización ocular, pues la larva migrante puede llegar a la coroides, retina y nervio óptico (Komnenou y Koutinas, 2007).

Las neoplasias

Como linfomas y leucemias cursan también con linfadenomegalia (OPS, 1996). El linfoma supone el 5-7% de todas las neoplasias caninas y el 90% de las neoplasias de origen hematopoyético, El aspirado con aguja fina evaluado por un clínico experimentado puede ser suficiente para el diagnóstico del linfoma multicéntrico, si bien la confirmación se da por la demostración de ciertas características en la biopsia ganglionar (Ramírez, 2008).

Babesia spp.

Cursa con letargia, debilidad, mucosas pálidas, anorexia y mal aspecto general. La anemia, hiperglobulinemia y trombocitopenia son las alteraciones laboratoriales más comunes. La observación del parásito en el frotis sanguíneo ha sido el método diagnóstico básico durante muchos años, también se usa IFI y PCR (Roura, 2006; Breitschwerdt, 2007).

Histoplasma capsulatum

Produce micosis que suele ser sistémica, es de tipo piogranulomatosos y en ellas se puede observar abundantes células tipo levaduras redondeadas de unas 2-4 µm de diámetro. Estos organismos son basófilos y suelen estar en el interior de una vacuola fagocítica en el citoplasma de los macrófagos. El diagnóstico diferencial se da a nivel de la microscopía que se basa en que *H. capsulatum* se observan los gamontes y en *Leishmania spp.* se observa el quinetooplasto. Los signos clínicos sugestivos son apatía, anorexia, mucosas pálidas, fiebre, pérdida de peso, diarrea, vómitos y dolor muscular (Pérez, 2000; Dantas, 2008).

Con todas aquellas enfermedades cutáneas que cursan con dermatitis y depilación como demodicosis, dermatofitosis, sarna sarcóptica, dermatitis por pulgas, dermatitis infecciosas, dermatitis atópica, seborreas primarias, neoplasias cutáneas (Miró, 2007a, 2007b).

12.7. Coinfecciones

Podemos sospechar de una coinfección con leishmaniosis cuando se trata de caninos de edad avanzada que viven en áreas endémicas, signos clínicos atípicos, no respuesta a tratamientos convencionales, persistencia de hipergammaglobulinemia, altos títulos de anticuerpos o leucopenia (Castagnaro *et al.*, 2007; Roura, 2007).

Las infecciones simultáneas pueden ser *Leishmania* con *Ehrlichia canis*, *Neospora*, *Hepatozoon*, *Bartonella*, *Babesia*, *Rickettsia*, *Dirofilaria* o *Trypanosoma cruzi*. También es posible la coinfección con dos especies distintas de *Leishmania*, pues hay un reporte de una infección mixta con *Leishmania (Viannia) braziliensis* y *Leishmania (Leishmania) chagasi* en un perro naturalmente infectado de Brasil (Madeira *et al.*, 2006; Castagnaro *et al.*, 2007; Oliva, 2007; Dantas, 2008).

Es muy común diagnosticar coinfecciones con *Sarcoptes* o *Demodex*, para prevenirlas aplicar periódicamente ectoparasiticidas (Roura, 2007).

13. Tratamiento

La progresión de la enfermedad está asociada a una inmunidad celular deprimida y una fuerte respuesta humoral, por lo que una terapia efectiva, tiene que venir acompañada de una significativa disminución de anticuerpos reflejo de la muerte de parásitos y la eliminación de antígenos (Miró, 2007b).

El tratamiento debe instaurarse con prontitud pues de lo contrario es frecuente la muerte tanto en humanos como en perros, sin embargo en algunos países está prohibido el tratamiento de la Lcan. En Brasil el estado prohíbe el tratamiento de los caninos con los mismos fármacos de uso humano y aplica para el Médico Veterinario que lo realice, las penalidades e infracciones del Código de Ética Profesional (Dantas, 2008; Ministério da Saúde, 2008).

Sólo un porcentaje de perros responden al tratamiento con curación de forma estéril, un alto porcentaje (encima de 74%) recupera la capacidad de infectar a los flebotomos a los pocos meses después del tratamiento (Mazloumi *et al.*, 2002).

Por lo tanto, el tratamiento contra *Leishmania* no está asociado con la eliminación de parásitos, la interrupción de la infectividad a los vectores o la prevención de recaídas clínicas de la enfermedad. Un tratamiento exitoso ofrece sólo mejoría clínica temporal y no logra la eliminación del parásito, por lo que los perros tratados se convierten en una fuente de infección para el vector (Baneth, 2007).

13.1. Antimoniales pentavalentes

Son las drogas de primera elección para el tratamiento de leishmaniasis humana y canina (Baneth, 2002).

a) Mecanismo de acción

Está aceptado que el antimonio pentavalente es un profármaco que tiene que reducirse a su forma trivalente para ejercer su acción, se piensa que actúan inhibiendo algunas enzimas glucolíticas del parásito al reaccionar con los grupos sulfhidrilos, perturbando el metabolismo energético debido a interferencias con la glucólisis y la β -oxidación de ácidos grasos que tiene lugar en las organelas llamadas glucosomas, con lo que se bloquea la generación de ATP y GTP, la menor cantidad de nucleótidos trifosfato favorece la disminución de la síntesis de macromoléculas, lo cual contribuye a la baja viabilidad de los microorganismos expuestos (Castro *et al.*, 2003; Pérez, 2007).

b) Dosis

Desde el principio del tratamiento la dosis de antimonio de meglumine es 37-50 mg/kg/SC/BID, siguiendo las recomendaciones de la OMS para el tratamiento de la leishmaniosis

humana, se aconsejan ciclos de tratamiento de 4-6 semanas (Castagnaro *et al.*, 2007; Miró, 2007a, 2007b).

Antimoniato de meglumine 60mg/kg/día más aminosidina 5.25mg/kg SC por 3 semanas (Ciaramella y Corona, 2003).

La asociación con alopurinol ha demostrado que la asociación de los dos principios activos es sinérgica, observándose una mayor eficacia, que permite administrar dosis inferiores y durante menos tiempo, lo que favorece la tasa de curaciones y que las recaídas se presenten más tarde y más espaciadas, algunos protocolos son:

Antimoniato de meglumine 100mg/kg/día junto con alopurinol 20mg/kg PO por 20 días, luego alopurinol solo por un mes a la misma dosis (Martínez y Ceron, 2005).

Antimoniato de meglumine 60 mg/kg/día más alopurinol 20 mg/kg PO hasta la resolución de los signos clínicos. Con esta combinación se retrasa 10 meses las recaídas (Ciaramella y Corona, 2003).

Antimoniato de meglumine combinado con alopurinol durante un mes (fase de inducción leishmanicida), seguido de alopurinol solo, durante varios meses, como terapia de mantenimiento (actividad leishmanioestática) (Milteforan®, 2007).

Si los parámetros de creatinina se incrementan, es necesario reducir la dosis o discontinuar la administración (Castagnaro *et al.*, 2007).

c) Presentaciones

Existen desde los años 40 como (Pérez, 2007):

- ✓ **Estibogluconato de sodio (Pentostam® Glaxo Wellcome Foundation)** Ampollas de 2 ml y 5 ml, contiene 100 mg Sb/ml (CDC, 2007b). Conteniendo 30 a 34% de antimonio pentavalente, descubierto por Schmidt en 1936 (MINSA, 2000).
- ✓ **Antimoniato de meglumine ó Antimoniato de N-metilglucamina (Glucantime® Rhone Poulenc Rorer)** Ampollas de 5 ml en solución al 30%, contiene 85 mg Sb/ml (CDC, 2007b).

d) Farmacocinética

No se absorben en el tracto digestivo, por lo que deben ser administrados por vía parenteral. La eliminación es prolongada y refleja la conversión de los antimonios pentavalentes Sb(V) (prodrogas), mediante reducción biológica, a la forma trivalente Sb(III) en el interior de los macrófagos para poder ejercer su acción. Su eliminación es renal, más del 80% es excretado en orina dentro de 9 horas de la administración, a las 12 horas los valores plasmáticos están muy por debajo de lo que posiblemente son concentraciones inhibitorias para el crecimiento del parásito, por lo que se recomienda una segunda dosis diaria para mantener una concentración inhibitoria de

Sb(V) durante la mayor parte del día (García *et al.*, 1998; Baneth, 2002; Croft *et al.*, 2006; Miró, 2007b).

e) Recaídas

La respuesta al tratamiento desde el punto de vista clínico es evidente (excepto los resistentes a la estiboterapia como en la India, o los que presentan complicaciones hepáticas o renales), sin embargo la gran mayoría termina por presentar una recaída que evidencia la falta de curación parasitológica, necesiéndose nuevos ciclos de tratamiento para mantener la carga parasitaria en los niveles más bajos posibles. Una respuesta terapéutica es más favorable en las fases iniciales de la enfermedad. Después de cada recaída se produce una disminución de la sensibilidad al antimonio de meglumine, lo que demuestra el peligro y muchas veces la inutilidad de los tratamientos repetidos. El uso de los antimoniales en el tratamiento de la Lcan, es un argumento frecuentemente utilizado para explicar la aparición de resistencias (Alvar, 2001; Baneth, 2002; Piscopo y Mallia, 2006; Stuart *et al.*, 2008).

f) Reacciones adversas

No existe acumulación en el organismo, pese a eso se manifiesta toxicidad debido a que provocan la unión de grupos sulfhidrido y alteran la estructura terciaria de las proteínas, así como los lugares de acción de numerosas enzimas, por lo que pueden dar lugar a la aparición de signos de estibointolerancia (que se manifiestan tras las primeras administraciones y remiten al suspender la terapia) o la estibotoxicidad (que aparece al final del tratamiento) (Ciaramella y Corona, 2003; Miró, 2007b).

Estos signos pueden manifestarse con la aparición de fiebre, tos persistente, trastornos del sistema musculoesquelético (artralgias y mialgias) que se manifiestan por dificultad en la locomoción, trastornos gastrointestinales, pérdida del apetito, toxicidad hepática y renal. Pueden aparecer efectos adversos en el punto de inoculación, como formación de abscesos, tumefacción local y fibrosis o hemorragias diseminadas, por lo que se recomienda la rotación del lugar de las aplicaciones e incluso en perros grandes repartir la dosis subcutáneas en varios puntos (Castagnaro *et al.*, 2007; Miró, 2007b).

La estibointolerancia se manifiesta a los pocos días del comienzo del tratamiento se observa un empeoramiento del estado general del perro y aumento del título de anticuerpos, debido a la liberación masiva de antígeno originado por la muerte de los amastigotes, aparición de reacciones de hipersensibilidad (nódulos cutáneos granulomatosos, uveítis y queratoconjuntivitis ulcerosa), que obliga a cesar el tratamiento por unos días hasta que se reinicia, a veces con dosis más bajas (Baneth, 2002; Miró, 2007b).

13.2. Anfotericina B

Es un antibiótico macrólido poliénico de bajo espectro, con siete dobles enlaces etilénicos, derivado de *Streptomyces nodosus*, muy activo frente a hongos y *Leishmania*, pero no frente a bacterias. Los lípidos representan hasta el 15% del peso de *Leishmania*, de ellos los lípidos neutros como los esteroides y ésteres de esteroles, son muy abundantes (Ciaramella y Corona, 2003; Pérez, 2007).

a) Mecanismo de acción

El medicamento se une al ergosterol (predominante en estos microorganismos, en las células de mamíferos predomina el colesterol), de la membrana celular del parásito produciendo alteraciones en la permeabilidad, formando poros acuosos que favorecen la pérdida de constituyentes celulares y originan la muerte de los parásitos por lisis osmótica al haber pérdida de potasio intracelular, aminoácidos y purinas, lo que lo convierte en un fuerte leishmanicida (Baneth, 2007; Pérez, 2007).

b) Presentaciones

- ✓ La forma convencional Zyloric® y Fungizone® (Martínez y Ceron, 2005).
- ✓ En forma liposomal como AmBiosome®, en complejo lipídico Abelcet® y en dispersión coloidal Amphotec® (Castro *et al.*, 2003).

La larga duración del tratamiento, la toxicidad y los fracasos terapéuticos han motivado la búsqueda de fármacos alternativos como la anfotericina B en formulación lipídica, donde las moléculas lipídicas capaces de atrapar o englobar medicamentos son transportadas por el plasma para liberar su contenido lentamente. Los macrófagos presentan especial apetencia por ellas por lo que el fármaco tiene un efecto diana en *Leishmania* (Alvar, 2001; Figueras *et al.*, 2003).

c) Dosis

Anfotericina B vehiculada (AmBiosome®) 3 mg/kg/IV días 1, 2, 3 y 10 o días 1, 2, 3, 4, y 10. Se debe evaluar los valores de creatinina y discontinuar su administración cuando esta llegue a valores de 2.5 mg/dl hasta que se normalice. Se debe administrar diluida en solución salina fisiológica ó de dextrosa al 5% (10-20 ml) por vía intravenosa lenta (5-10 minutos) cada 2 o 3 días hasta llegar a una dosis acumulada de 8 a 15 mg/kg (Ciaramella y Corona, 2003; Miró, 2007a).

d) Reacciones adversas

Anorexia, náuseas, vómitos, flebitis localizada, anemia, elevación de los niveles séricos de urea y creatinina, estomatitis. La nefrotoxicidad hace imprescindible una estrecha monitorización de la función renal; es debida a la vasoconstricción renal, disminuye la tasa de filtración glomerular y un aumento en los niveles de creatinina sérica y de nitrógeno ureico. Que pueden ser inhibidos

por aumento de sodio previo al tratamiento y atenuado por la administración concomitante de furosemina, lo que indicaría que la respuesta nefrotóxica aguda en caninos es debida a un mecanismo túbuloglomerular. Macroscópicamente el riñón aparece pálido y ligeramente aumentado de tamaño en la mayoría de los perros tratados. Microscópicamente las alteraciones histológicas renales más habituales se producen en los túbulos y en la pelvis renal, donde aparecen una inflamación intersticial, focos necróticos y depósitos de calcio. También existe una disminución en la densidad de la orina acompañada de poliuria, polidipsia, fiebre, vómitos y anorexia (Ciaramella y Corona, 2003; Miró, 2007b).

13.3. Alopurinol

Es una pirazolopirimidina (análogo de purina) es un análogo estructural (isómero) de la hipoxantina (Pérez, 2007).

a) Mecanismo de acción

Se basa en la incapacidad de los hemoflagelados, entre ellos *Leishmania*, para sintetizar *de novo* las purinas necesarias para la formación de ácidos nucleicos y disminuyendo la capacidad de sintetizar ATP, lo que hace que tengan que obtenerlas de su hospedador. El alopurinol produce inhibición de las enzimas que llevan a cabo la interconversión de las purinas, mediante la alteración del metabolismo de las pirimidinas y por mecanismos que incrementan el catabolismo de ARN, con la consiguiente restricción proteica, no quedando disponibles las purinas para ser reincorporadas en la síntesis de los ácidos nucleicos del protozoo, frenando el crecimiento del parásito por lo que tiene propiedades leishmanioestáticas (Baneth, 2007; Miró, 2007b; Pérez, 2007).

b) Dosis

Alopurinol 10-20 mg/kg/día PO repartida en dos o tres tomas debido a su corta vida media de 1–2 horas. El tratamiento debe prolongarse entre 6 y 18 meses, aunque algunos clínicos lo recomiendan de por vida combinado con antimoniales pentavalentes en la fase inicial del tratamiento (Milteforan®, 2007; Miró, 2007).

Es útil para disminuir la proteinuria y la evolución de la nefropatía que no curse con creatininemia a la dosis de 10 mg/kg/PO/BID por 6 meses (Castagnaro *et al.*, 2007).

c) Reacciones adversas

Principalmente náuseas, vómitos, diarrea y elevación de las enzimas hepáticas AST, ALT y fosfatasa alcalina, y debido al uso prolongado se pueden formar cristales y/o urolitos de xantina, por lo que es aconsejable administrar una dieta a base de proteínas específicas (caseína). La vida media de la droga se incrementa en pacientes con filtración glomerular disminuida sin embargo no

parece tener efectos adversos detectables en riñones (Baneth, 2002; Castagnaro *et al.*, 2007; Miró, 2007a, 2007b).

13.4. Paramomicina (Aminosidina)

Son dos antibióticos aminoglucósidos muy similares, hasta el punto que se habla de ambos indistintamente. El primero se obtiene de *Streptomyces rimosus* y el segundo de *S. chrestomyceticus* (Pérez, 2007).

a) Mecanismo de acción

Ambos actúan sobre el ribosoma bloqueando la síntesis proteica de *Leishmania*. Tienen efecto sinérgico con los antimoniales por lo que se suelen utilizar asociados, o bien como terapia aislada de segunda elección (Miró, 2007b).

Dosis: Desde 5.25 mg/kg/SC/SID por 3 semanas (Ciaramella y Corona, 2003) hasta 10-20mg/kg/SC/SID (Miró, 2007b).

13.5. Pentamidina

a) Mecanismo de acción

Es una diamina aromática que inhiben la síntesis de proteínas y de fosfolípidos produciendo daños irreversibles en el ADNk provocando su desintegración y el colapso del potencial de membrana, inhibe la fosforilación oxidativa (Castro *et al.*, 2003; Pérez, 2007).

b) Dosis

(Lomidine®) 4mg/kg/IM/SID en días alternados por 3 o 4 semanas ó 4mg/kg/IM/SID cada 3 días por dos ciclos de 8 inyecciones con un intervalo de 3 semanas entre ciclos. No sobrepasar los 0.03 g/kg (Ciaramella y Corona, 2003; Miró, 2007b).

c) Reacciones adversas

La inyección es altamente irritante, además de vómito, salivación, hipotensión, diarrea, anafilaxis, hipoglucemia, daño hepato renal, trombocitopenia (García *et al.*, 1998).

13.6. Miltefosina

La hexadecilfosfocolina es un fosfolípido de la membrana celular del parásito, que se encuentra en estudios clínicos fase III, tiene actividad antiproliferativa, utilizado como cancerostático al interrumpir el envío de señales de la célula y la síntesis de la membrana. Se utiliza en el tratamiento de las metástasis del cáncer de mama. Fue registrado para el tratamiento de LV en Colombia el 2005 (Milteforan®, 2007; Stuart *et al.*, 2008).

a) Mecanismo de acción

Es un inhibidor de la transducción de señal. Se dirige a las vías metabólicas fosfolipídicas del parásito (efectos directos en el metabolismo de fosfatidilinositol). Es ligeramente lipofílica e hidrofóbica, y por ello capaz de penetrar membranas celulares y causar el rápido e intenso metabolismo de éter-fosfolípidos en especies de *Leishmania*. Interrumpe las vías de señalización celular y la síntesis de la membrana celular del parásito a través de los siguientes métodos:

- Inhibe la biosíntesis de fijadores GFI (glicosil-fosfatidil-inositol) – un complejo que fija moléculas superficiales claves para la supervivencia intracelular de los amastigotes de *Leishmania*.
- Perturba la transducción de señal actuando sobre fosfolipasa C y proteína-kinasa C específicas de *Leishmania*, enzimas que desempeñan un papel crítico en la regulación y el control del crecimiento y la diferenciación celular del parásito.
- Inhibe la biosíntesis de fosfatidilcolina, una molécula clave en la bicapa lipídica de la membrana celular de *Leishmania*.

A causa de estos efectos en las vías mitogénicas del parásito, miltefosina finalmente induce una muerte celular similar a la apoptosis. También se cree que puede activar ciertas funciones inmunes (Milteforan®, 2007).

b) Dosis

2 mg/kg/PO/SID por 28 días consecutivos. En combinación con anfotericina y paramomicina se potencian. Con alopurinol son toxicológicamente compatibles. Se puede usar en perros con enfermedad renal (Seifert y Croft, 2006; Milteforan®, 2007).

c) Presentaciones

- ✓ Milteforan® 20 mg/ml solución oral para perros (Milteforan®, 2007).
- ✓ Impávido® se ha registrado en Colombia para tratar la LC (Pérez, 2007).

d) Reacciones adversas

Trastornos digestivos de distinta consideración (vómitos, diarreas y anorexia) pero de pronta recuperación. También es necesario combinarlo con otros medicamentos para evitar que aparezca resistencia. Debido a su toxicidad reproductiva no debe administrarse a perras gestantes, lactantes y de cría (Milteforan®, 2007; Miró, 2007a; OMS, 2007).

13.7. Sitamaquina (WR6026)

La 8-aminoquinolina está en estudios de fase II para el tratamiento de LV en India, Kenia y Brasil. El mecanismo de acción podría envolver un ciclo redox. El principal efecto secundario es

severo daño renal. Su principal atractivo es su eficacia por vía oral por lo que está en desarrollo por GlaxoSmithKline (Croft *et al.*, 2006; Chappuis *et al.*, 2007; Pérez, 2007).

13.8. Ketoconazol

a) Mecanismo de acción

Es un imidazol que inhibe la síntesis de ergosterol de la membrana del parásito y diversas funciones metabólicas que conllevan a su muerte (Pérez, 2007).

b) Dosis

7 mg/kg/PO/SID por vía oral, durante 2–3 meses (Ciaramella y Corona, 2003).

13.9. Metronidazol

Puede producir efectos secundarios como anorexia, vómitos, diarreas, hepatotoxicidad, hematuria, neutropenia y alteraciones neurológicas (Miró, 2007b). La dosis para Metronidazol es de 25 mg/kg/SID más espiramicina 150,000 UI/kg/PO/SID durante 30 días (Castagnaro *et al.*, 2007).

13.10. Inmunomoduladores

La alteración de la respuesta inmunitaria severa que se producen durante la enfermedad, sugiere la posibilidad de utilizar fármacos que potencien la inmunidad celular (inmunoestimulantes), considerada la inmunidad protectora, o depriman la inmunidad humoral (inmunosupresoras), que no intervienen en los mecanismos de defensa del hospedador. Estos fármacos generalmente van asociados a tratamientos específicos (Castagnaro *et al.*, 2007; Miró, 2007b).

13.10.1. Fármacos inmunosupresores

a) Prednisolona

Los más utilizados son los corticoides, principalmente la prednisona y prednisolona. Como deprime la inmunidad humoral, la producción de anticuerpos disminuye y la formación de inmunocomplejos se reduce. Sin embargo, también deprimen la inmunidad celular. Por lo cual se debería evitar el uso de glucocorticoides en los animales con leishmaniosis, ya que pueden provocar un aumento de la replicación del parásito. Solo es recomendable, casi exclusivamente, cuando aparecen de forma concomitante procesos graves debidos a la aparición de lesiones por depósitos de inmunocomplejos (Castagnaro *et al.*, 2007; Miró, 2007b).

Dosis: Efecto antiinflamatorio: 0,5 y 1 mg/kg/día, pero para conseguir el efecto inmunosupresor habría que llegar a 2,2–6,6 mg/kg/día (Castagnaro *et al.*, 2007).

13.10.2. Fármacos inmunoestimulantes

La utilización de estos fármacos tiene como objetivo la estimulación de la inmunidad celular y la activación de los macrófagos, debido a que la progresión de la enfermedad desemboca en una inmunosupresión, al seguirse la ruta Th2 con descenso en los niveles de IL-2 e IFN γ , propios de la ruta Th1. Por esto se ha sugerido asociar a la quimioterapia, en el tratamiento de los casos resistentes, donde es más probable que se llegue al agotamiento inmunológico, agentes de origen microbiano o polímeros sintéticos capaces de activar el sistema reticuloendotelial (Castagnaro *et al.*, 2007; Miró, 2007b).

a) Citoquinas

La incorporación al mercado el IFN- γ , una citocina recombinante produce la activación de los macrófagos con inducción de la síntesis de IL-1 y TNF- α , aumenta la expresión de los genes que regulan el complejo mayor de histocompatibilidad de clase II, induce la respuesta inmune protectora mediada por células Th1 CD4+ y, de modo particular en la leishmaniasis, potencia el depósito de los antimoniales dentro de los macrófagos. El IFN- γ tiene marcados efectos secundarios como fiebre, escalofríos y granulocitopenia, además de un elevado costo. En perros no existe suficiente información acerca del tratamiento con citoquinas, sin embargo, sí se ha observado que los perros que desarrollan una respuesta celular de tipo Th1 permanecen asintomáticos (Castagnaro *et al.*, 2007; Miró, 2007b).

b) El Levamisol

Es el isómero levógiro del tetramisol; su utilización habitual es como antihelmíntico, con un amplio espectro de acción. En la Lcan no se emplea de forma habitual y cuando se utiliza va asociado a un tratamiento específico convencional (Miró, 2007b). Estimula la inmunidad mediada por células, potenciando la diferenciación de los linfocitos, favorece la fagocitosis y la destrucción intracelular de los parásitos. Se sabe también, que en individuos sanos no incrementa la actividad inmunitaria (Ciaramella y Corona, 2003).

Dosis: Oscila entre un tercio y un cuarto de la dosis empleada como antihelmíntico (5-10 mg/kg). Es un fármaco con un margen de seguridad bastante amplio y sus efectos secundarios a estas dosis son prácticamente inexistentes. En la Lcan, el levamisol se emplea asociado al tratamiento con alopurinol (20 a 30 mg/kg cada 12 horas) (Ciaramella y Corona, 2003).

c) El imiquimod

Es una amina imidazoquinolina modificadora de la respuesta inmunitaria, que estimula la inmunidad celular innata y adquirida. Estimula a los receptores en las CPA e induce la síntesis y producción de citocinas Th1, activa y potencia la migración de las células de Langerhans hacia los nódulos linfáticos regionales, presentando los antígenos a los linfocitos T memoria. Imiquimod 5%

crema una vez al día, administrado con antimonio de meglumine podría ser una opción potencial en la terapia estándar de la Lcan (Festa *et al.*, 2006).

13.11. Manejo del paciente con leishmaniosis y enfermedad renal

En perros con leishmaniasis resulta fundamental llevar a cabo una adecuada valoración de la función renal, porque en esta patología existe una prevalencia muy alta de enfermedad renal crónica (ERC). Además es la principal causa de muerte de ésta enfermedad, la severidad de la afección renal presente en el momento del diagnóstico condiciona el tratamiento de la leishmaniasis e influye en la supervivencia de los pacientes (Miró, 2007b).

La evaluación inicial de estos pacientes debe incluir una historia clínica detallada y examen físico completo, porque el cuadro clínico que pueden presentar estos animales es muy variable. Las pruebas de laboratorio necesarias para el diagnóstico incluyen: hemograma, perfil bioquímico y urianálisis completo. Una vez confirmada la existencia de ER debe determinarse la PAS (presión arterial sanguínea) porque la ERC es la principal causa de HAS (hipertensión arterial sistémica) en el perro (Miró, 2007b).

13.11.1. Determinación de la PAS

En la práctica clínica habitual la PAS se determina mediante métodos indirectos (Doppler u oscilométrico). Miró, recomienda el siguiente protocolo:

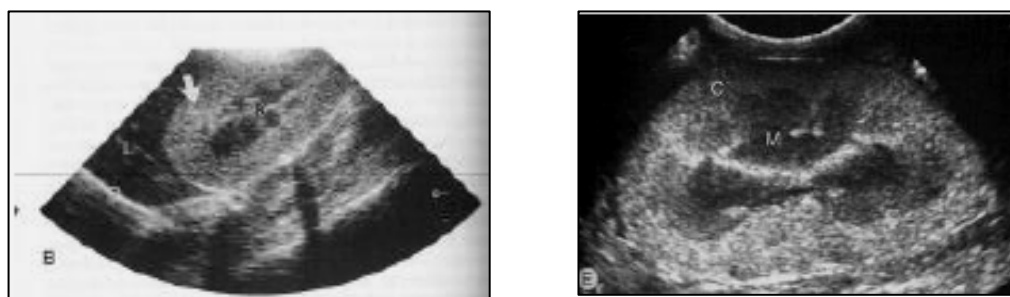
- La anchura del manguito empleado debe ser aproximadamente el 40% de la circunferencia del miembro en el punto de colocación.
- Siempre que sea posible, la presión debe ser determinada por la misma persona y mediante 2 métodos distintos.
- Con el método Doppler es conveniente rasurar la zona para detectar el pulso con mayor facilidad para tratar en lo posible de obviar la hipertensión inducida por ansiedad.
- La determinación de la PAS se realizará en un ambiente tranquilo, tras un periodo de aclimatación del animal de 10 minutos, previamente al examen físico, procurando que el perro se encuentre lo más cómodo posible y en presencia del propietario.
- Debe intentarse que el corazón y la arteria elegida para la medición se encuentren al mismo nivel. Si no es posible, el efecto gravitacional debe compensarse aumentando el valor obtenido en 1 mm Hg por cada 1.3 cm de distancia vertical entre el nivel del manguito y la válvula aórtica.
- Deben realizarse de 5 a 7 medidas en 2 puntos distintos, y en un tercer en caso de grandes discrepancias entre los 2 primeros.
- Resultados:
 - <150 mm Hg Son considerados valores normales de PAS.
 - 150-179 mm Hg Dudosos o positivos en presencia de signos clínicos compatibles.

>180 mm Hg En animales con enfermedades asociadas a HA son compatibles con hipertensión (Miró, 2007b).

13.11.2. Ecografía renal

Permite evaluar de modo no invasivo el tamaño y forma de los riñones, así como valorar la arquitectura renal interna. Aunque en la mayoría de perros con ER secundaria a leishmaniosis las anomalías ecográficas se limitan a incrementos en el grosor y en la ecogenicidad de la corteza renal, la ecografía facilita la detección de otras lesiones renales que pudieran coexistir con la leishmaniasis (Miró, 2007b).

Figura 33. Hiperecogenicidad de la corteza renal



(Marques, 2008)

13.11.3. Clasificación de según la severidad de la ERC y su tratamiento

La ERC puede clasificarse en diferentes grados de severidad siguiendo el sistema de clasificación de la Sociedad Internacional de Interés renal (IRIS) según la concentración sérica de creatina (Cr) en (Miró, 2007b):

- Estadío 1 Cr< 1.4 mg/dl (Existen otras evidencias de ERC como proteinuria)
- Estadío 2 Cr= 1.4-2 mg/dl
- Estadío 3 Cr= 2.1-5 mg/dl
- Estadío 4 Cr>5 mg/dl

Estadío 1

Enfermedad renal leve. Existen mínimas alteraciones clinicopatológicas. Títulos bajos de anticuerpos. En estos animales pueden emplearse los mismos fármacos leishmanicidas que en animales sin ERC y no suele ser necesario reducir la dosis de los mismos (Ferrer, 2009)

Los objetivos del tratamiento de la ERC proteinúrica son: reducir la proteinuria, controlar la PAS y reducir la hipertensión glomerular, reducir el riesgo de fenómenos tromboembólicos y controlar el proceso inflamatorio (Miró, 2007b).

Los fármacos de primera elección en el manejo de la ER secundaria a leishmaniasis son los inhibidores de la enzima de conversión de la angiotensina (IECAs) porque reducen la

proteinuria, la PAS y controlan la hipertensión glomerular, retardando la progresión de la enfermedad glomerular. Si el tratamiento con IECAs no normaliza la PAS, puede añadirse amlodipina. También se recomienda la administración de ácido acetilsalicílico (Miró, 2007b).

Las dietas con una moderada restricción proteica (3-4,5 gr de proteína /100 Kcal EM) pueden reducir la severidad de la proteinuria en algunos animales con enfermedad glomerular y por lo tanto es recomendable su uso. También es recomendable la administración de ácidos grasos omega-3 (1-5 g/día) (Miró, 2007b).

El seguimiento de estos pacientes incluye revisiones en 1, 2, 3, 6 y 12 meses. A partir de entonces dos revisiones anuales. En cada revisión se debe realizar:

- Examen clínico completo
- Proteínas totales - proteinograma
- Serología
- Bioquímica y urianálisis (ratio UPC)
- Hematología (Ferrer, 2009).

Estadío 2

Enfermedad renal moderada. Existencia de signos clínicos manifiestos. Es conveniente reducir las dosis de antimoniales de 100 mg/kg/24 h reducir a 50-35 mg/kg/12h por 4 semanas. En el caso de utilizar alopurinol, no es necesario disminuir la dosis (10 mg/kg/12h toda la vida o 1 año como mínimo). Los perros en este estadio pueden ser tratados con anfotericina B, pero deben extremarse las precauciones porque el agravamiento de la enfermedad renal obliga a suspender el tratamiento. Es necesario monitorizar la creatinina y la fosfatemia para reducir el riesgo de hiperparatiroidismo renal secundario, la restricción del fósforo en la dieta ha demostrado ser efectiva en el control de la hiperfosfatemia, además el empleo de dietas con una moderada restricción proteica que a su vez son restringidas en fósforo generalmente son suficientes para mantener el fósforo dentro de valores normales (Miró, 2007b; Ferrer, 2009).

El seguimiento de estos pacientes incluye las mismas revisiones que para el estadio anterior y ocasionalmente se debe realizar también:

- Recuento de CD4+, CD8+
- Test intradérmico con leishmanina
- Valoración detallada de la proteinuria
- PCR cuantitativa de sangre y/o médula ósea (Ferrer, 2009).

Estadío 3

Enfermedad renal grave. Existencia de signos clínicos patológicos. Los perros en este estadio no deben ser tratados con anfotericina B. La dosis de antimoniales debe reducirse a 10-30 mg/kg/12horas y combinarla con alopurinol. Básicamente el tratamiento es el mismo que para

animales en estadio 2, en cuanto a la restricción del fósforo en la dieta, debe añadirse al tratamiento un agente quelante (hidróxido de aluminio, acetato o carbonato cálcico 30-60 mg/kg). La fosfatemia se evalúa 4 semanas después y se ajusta la dosis según los resultados. Se viene recomendando el uso del calcitrol (2.5 ng/kg) para controlar el hiperparatiroidismo renal secundario (Miró, 2007b, Ferrer, 2009).

Estadio 4

Enfermedad renal muy grave e irreversible. Muchos animales en estadio 4 e incluso algunos en estadio 3 presentan fallo renal descompensado, con un marcado deterioro de su condición general. Si el propietario opta por iniciar el tratamiento, el primer paso es corregir la deshidratación y mejorar la condición hemodinámica del paciente. Es aconsejable la hospitalización del animal y la administración de fluidoterapia durante 48-96 horas, así como el tratamiento de las manifestaciones digestivas de la uremia. Si transcurrido ese periodo, el paciente se alimenta por si mismo, se continúa el tratamiento al igual que en los casos en estadio 3. En caso contrario debe considerarse la eutanasia (Miró, 2007b, Ferrer, 2009).

13.11.4. Fármacos

Ácido Acetilsalicílico

Es usado en perros con leishmaniosis y proteinuria para controlar la hipercoagulabilidad independientemente de la presencia o ausencia de creatininemia. Reduce la activación de las plaquetas al inhibir la ciclooxygenasa, para que no se exacerbe la condición de hipercoagulabilidad que ocurre en nefropatías con pérdida de proteína, reduciendo el riesgo de fenómenos tromboembólicos que existe en éstos pacientes (Castagnaro *et al.*, 2007; Miró, 2007b).

Dosis: 0.5-5 mg/kg/PO/BID (Miró, 2007b).

ACE inhibidoras

Enalapril es útil en perros con glomerulonefritis al reducir la presión sistémica probablemente reducen la presión glomerular, lo que disminuye la velocidad del desarrollo de lesiones tubulointersticiales, reduciendo la proteinuria usualmente a los 1 a 2 meses de la administración. La CLWG (Canine Leishmaniasis Working Group) sugiere usarla rutinariamente a la dosis de (0.5 mg/kg/PO/SID) en perros con leishmaniasis y proteinuria (UP/UC ratio > 0.7) y/o con creatininemia aumentada (Miró, 2007b).

Es vital verificar la creatinina en suero de manera seriada pues el empeoramiento de la función renal puede ocurrir especialmente durante las primeras dos semanas del inicio del tratamiento, en éste caso se debe reducir la dosis de la droga o si es necesario discontinuar la administración (Castagnaro *et al.*, 2007).

Terapia Anti-hipertensiva

La hipertensión arterial es un factor de riesgo probado en la progresión del daño renal. Buenos resultados se han obtenido usando un agente bloqueador de canales de calcio como la Amlodipina besilato a la dosis de 0.1-0.5 mg/kg/PO/SID. En asociación con una droga inhibidora de ACE que mejore la hemodinamia glomerular pues la droga podría incrementar la presión capilar glomerular. Si estas dos drogas no son suficientes para reducir la presión sistémica, podría aumentarse la dosis de la Amlodipina (si es usada a bajas dosis) o agregar como primera elección a un agente bloqueante β -adrenergico (atenolol: 0.5-1.0 mg/kg/PO/SID ó BID) ó un antagonista de la aldosterona (Miró, 2007b).

Un tratamiento anti hipertensivo es administrado cuando la presión sistólica es mayor de 180 mmHg (método Doppler), o entre 150 y 179 mmHg en asociación con signos clínicos o cambios como hemorragia retinal, cardiopatía hipertensiva, signos neurológicos corticales, proteinuria. Es exitoso cuando se logra reducir la presión arterial por debajo de 150-160 mmHg (método Doppler), de no lograrse esto al menos reducir en unos 50-60 mmHg del valor inicial. La reducción de la presión sistémica se obtiene en algunas horas del inicio del tratamiento (Castagnaro *et al.*, 2007; Miró, 2007b).

La terapia es indicada en perros que preservan la función renal y en perros con creatininemia aumentada. El uso incorrecto de anti hipertensivos puede reducir fuertemente la filtración glomerular. Por lo tanto, el monitoreo de creatininemia y de presión sistémica es recomendado durante la terapia (Miró, 2007b).

El monitoreo de la presión debe ser realizado varias veces al día durante los 2-3 primeros días, después con regularidad (por ejemplo cada 1-2 semanas) (Castagnaro *et al.*, 2007).

13.11.5. Dieta

El nivel de proteinuria se puede reducir usando una dieta baja en proteína. Sin embargo podría ser difícil mantener una adecuada condición corporal y una concentración normal de albúmina plasmática. Por ésta razón y por que los perros con leishmaniasis muestran pobre masa muscular, es importante evaluar cada caso individualmente. Sin embargo una dieta baja en proteína reduce los signos clínicos si el perro afectado tiene un incremento de creatininemia y muestra signos clínicos de uremia. Los ingredientes deben ser bajos en purinas para prevenir cálculos asociados al tratamiento. Además la disminución de fósforo en dieta puede disminuir la velocidad de la función renal e incrementar el tiempo de sobrevivencia de un perro con alta creatininemia (Castagnaro *et al.*, 2007; Miró, 2007b).

El uso de alimentos comerciales con baja proteína y bajos en fósforo es indicado en animales con creatininemia aumentada independientemente de la presencia o ausencia de proteinuria. Si el peso de los perros disminuye, es posible que el alimento no sea el adecuado (identificar factores que inducen la anorexia como las náuseas, úlceras gastrointestinales, dosis

altas de drogas y tratarlas adecuadamente con antieméticos o antagonistas H2) o no satisfaga los requerimientos diarios (cambiar de alimento) (Castagnaro *et al.*, 2007).

Ácidos esenciales ω -3

La suplementación muestra un efecto benéfico en la hemodinamia glomerular al prevenir el deterioro de la filtración glomerular y la estructura renal. Además mantiene el nivel de proteinuria en valores ligeramente bajos, sin embargo este efecto no es significativo. Se necesitan más estudios en perros (Castagnaro *et al.*, 2007).

13.12. Seguimiento

A los pocos días de comenzar el tratamiento empieza la regresión de los síntomas, desaparece la fiebre, aumenta la albúmina sérica, se normalizan los valores hemáticos, disminuye la hepato esplenomegalia. La alteración del proteinograma es la primera señal de recaída (Lamothe, 1999).

Para detectar las recaídas se debe realizar un monitoreo serológico, la primera muestra se debe tomar al mes de que los signos clínicos han desaparecido, luego a los 3, 6 y al año (MINSA, 2000).

Las pruebas serológicas son muy útiles en el diagnóstico de la Lcan, pues la caída de anticuerpos se produce a partir de los **dos meses** después de la cura clínica pero pueden persistir hasta **dos años**. Debido a que la curación clínica no es paralela con la erradicación de los parásitos, la PCR nos permite valorar el auténtico éxito o fracaso del tratamiento para alcanzar la curación estéril, ya que solo se encuentra presente el ADN parasitario hasta las **tres semanas** (Roura, 2007).

Se considera que la cura es estéril si el aspirado de médula es negativo, desaparecen todos los signos clínicos, la bioquímica sanguínea se ha normalizado y dos pruebas de PCR de médula ósea separadas por 6 meses son negativas (Lamothe, 1999).

14. Impacto en salud pública

En el mundo hay 14 millones de personas infectadas y cada año se registran 2 millones de casos nuevos. De ellos 500,000 viscerales, que provoca más de 50,000 defunciones; y 1'500,000 casos cutáneos. La población en riesgo se eleva a 350 millones de personas (OMS, 2007). La leishmaniasis contribuye considerablemente a la disminución de la productividad laboral, a la posibilidad de aparición de lesiones que producen desfiguración e incrementa la pobreza porque su tratamiento es costoso, variando un ciclo de tratamiento entre 30\$ (con estibogluconato sódico genérico), 120\$ (con antimonio de meglumina) ó 150\$ (con estibogluconato sódico). En caso de recaída, los pacientes deben tratarse con medicamentos de segunda línea mucho más tóxicos,

como la anfotericina B (60\$), la anfotericina B liposómica(1500\$), la pentamidina (70\$), paromomicina (10\$) o miltefosina (150\$) (OMS, 2007).

15. Medidas de prevención y control

15.1. Evaluación del riesgo de transmisión

Para evaluar el riesgo de transmisión y establecer las medidas de control oportunas, es imprescindible definir los siguientes los factores epidemiológicos que determinan si es posible o no la transmisión del parásito en una zona determinada (Alvar, 2001):

15.1.1. Factores dependientes del vector

- Densidad de población de flebótomos (en zonas endémicas un animal puede recibir hasta varias docenas de picaduras por noche) (Alvar, 2001).
- La infección de los flebótomos con los promastigotes de *Leishmania* requiere disección individual del tubo digestivo utilizando microscopía, son necesarias destreza y experiencia para la disección de estos diminutos insectos (Oshaghi *et al.*, 2008).
- Determinar la infección de las especies de *Leishmania* de áreas donde la enfermedad es endémica, para predecir el riesgo de expansión de la enfermedad (Oshaghi *et al.*, 2008).
- La mayor expectativa de vida favorece que un flebótomo pueda infectarse a lo largo de ella. Es dependiente de la especie de flebótomo y de la temperatura y humedad relativa, pues a mayor temperatura y humedad se acorta el tiempo que tardan los amastigotes ingeridos en transformarse en promastigotes infectivos (Alvar, 2001; MINSA, 2002c; Quintero y Rodríguez, 2008).
- Duración del ciclo gonotrófico. Una vez infectado el insecto transmite el parásito en cada una de las ingestas que realice (Alvar, 2001).
- Las especies endofílicas son más fáciles de controlar mediante barreras mecánicas y el uso de insecticidas residuales (MINSA, 2000; Lainson y Rangel, 2005; Diniz *et al.*, 2008).
- El alcance del vuelo de los flebótomos no es un factor de mayor importancia al ser muy corto (Roberts, 2006; Miró, 2007b).
- El fototropismo es positivo en los flebótomos, motivo por el que acuden en la noche a picar dentro de las viviendas (Roberts, 2006; Miró, 2007b).

15.1.2. Factores dependientes del reservorio

- Alta densidad del animal (Alvar, 2001).

- Proximidad del reservorio, vector y humano (Alvar, 2001).
- Evolución crónica de la infección. En el canino el periodo pre patente puede ser desde 3 meses hasta varios años y la vida media de un perro con leishmaniasis puede ser de dos a tres años (Reithinger y Davies, 1999; Baneth, 2007).

15.1.3. Receptividad del humano a la infección

- Hábitos de la población. (Zorrilla *et al.*, 2005).
- Tipo de vivienda (Desjeux, 2002; Rondón, 2006; Sousa y Pearson, 2009).
- Profesiones (Sousa y Pearson, 2009).
- Proximidad del humano al hábitat del vector (Desjeux, 2002; Sousa y Pearson, 2009).

15.2. Educación Sanitaria

El trabajo educativo se debe realizar en la comunidad, incluida la población escolar. De esta manera los habitantes toman conciencia de que deben protegerse con medidas mecánicas y químicas y facilitan el trabajo de los agentes de salud, trabajo que se puede prolongar durante años en zonas altamente endémicas. Si este es el caso, es muy útil realizar campañas periódicas de divulgación por medios audiovisuales, charlas, panfletos, etc. Las encuestas de capacitación, aptitud y preferencias permiten evaluar el grado de conocimientos adquiridos por la población en esta etapa preparatoria y evaluar la predisposición a colaborar (Isaza, 1999; Alvar, 2001).

15.3. Medidas de protección individual

Las medidas de protección individual tienen por objeto reducir el riesgo de contacto del vector con el hospedero en los medios naturales evitando la picadura de *Lutzomyias* infectadas.

15.3.1. Interceptación del contacto con el hospedador

15.3.1.1. En seres humanos

Deben difundirse a la comunidad y a grupos ocupacionales de riesgo. Es fundamental cuando la transmisión de la leishmaniasis se realiza en el extradomicilio, como lo que ocurre entre los 800 y 1200 msnm en Puno (MINSA, 2000; MINSA, 2005b). Mediante:

- Mosquiteros (mallas finas) de 0.2mm impregnados con insecticidas de larga duración que tienen un costo de US\$ 5 por unidad. Pueden ser embebidas en permetrina o deltametrina. Tienen una duración de varios meses, usados en puertas, ventanas y alrededor de camas (MINSA, 2000; CDC, 2007a; OMS, 2007; Miró, 2008).
- Uso de espirales que contengan piretroides (MINSA, 2000).

- El uso de repelentes en cremas o líquidos que contengan como principio activo el DEET (N,N-dietilmetatoluamida), a una concentración de 30-35% protege aproximadamente 4 a 6 horas. En niños no usar más del 10%, y nunca en menores de 2 años de edad (CDC, 2007a).
- Fumigar la ropa con permetrina, y reaplicarla después de 5 lavadas. Usar indumentaria que proteja al máximo la exposición de la piel (CDC, 2007a).

15.3.1.2. En caninos

- No sacarlos a pasear al anochecer ni dejarlos dormir en el exterior (Miró, 2007b).
- Cortinas o mallas finas de 0.2mm en sus cobertizos (MINSA, 2000, Miró, 2008).
- El uso de insecticidas sobre el canino produce dos efectos que interrumpen el ciclo de alimentación del vector:

a) Efecto repelente

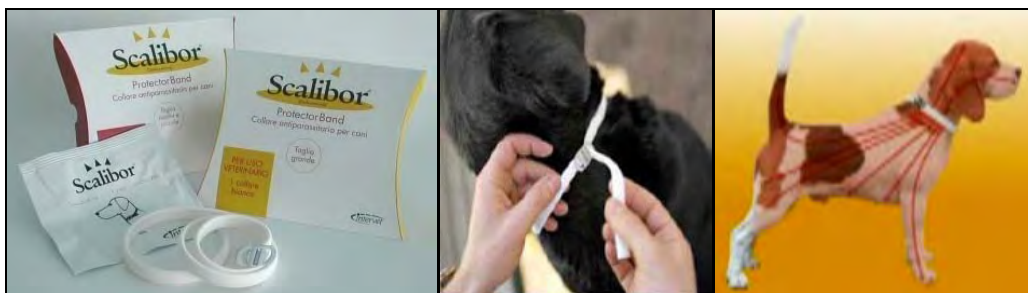
Por el que se interrumpe la transmisión al no llegar el flebótomo a ingerir sangre. Para valorar el efecto repelente se utilizan dos parámetros, el efecto anti-aterizaje ("anti-landing") y el efecto anti-alimentación ("anti-feeding"). Puesto que la aproximación de los flebótomos a su presa se hace en saltitos, es muy difícil establecer si se trata de una aproximación o de un auténtico intento de picadura repelido por el insecticida, por lo que generalmente sólo se utiliza el segundo concepto (Killick-Kendrick *et al.*, 1997; Diniz *et al.*, 2008).

b) El efecto insecticida

Por el que el flebótomo que se alimente con sangre del perro tratado muere (Killick-Kendrick *et al.*, 1997). Entre los más utilizados se encuentran:

- Collares de plástico impregnados con 4% deltametrin y el excipiente trifenil fosfato, comercializado con el nombre de Scalibor® (Intervet International), consiguió proteger del 90% de las picaduras durante 34 semanas en Europa (Killick-Kendrick *et al.*, 1997; Diniz *et al.*, 2008). No se han notificado efectos secundarios. En Irán se logró proteger a los perros y además reducir el riesgo de infección en niños iraníes (Mazloumi *et al.*, 2002). Los collares van liberando de manera progresiva el deltametrin por acción del roce del collar con el pelo, mediante la liberación de las partículas de trifenil fosfato que se encuentran en la matriz del PVC del que está hecho el collar. El deltametrin penetra en el tejido celular subcutáneo y se distribuye por la grasa de la piel alcanzando todos los puntos del animal aunque hay más concentración en la proximidad del cuello y cabeza del animal (Roberts, 2006). Tienen como limitación que pueden romperse o perderse debido a peleas o al juego del animal (Otranto *et al.*, 2007).

Figura 34. Collares impregnados con Deltametrin



(Fuente: Scalibor, 2009; Miró, 2008)

- La solución tópica de permetrin EXspot® (Schering Plough) se aplica en el dorso del perro y se distribuye e impregna por el estrato córneo de la superficie del animal (Alvar, 2001).
- La solución tópica pulverizable que contiene una combinación de permetrin y piriproxifeno Duowin® se utilizan 5 ml/kg. El piriproxifeno es un regulador de la ecdisona, hormona de crecimiento de los insectos. La mortalidad alcanzada es moderada (24% a la primera hora) por ser un producto con mayor efecto anti-alimentación (Alvar, 2001; Milteforan®, 2007)
- La combinación de imidacloprid al 10% y permetrina al 50% Advantix® (Bayer Alemania), en una formulación en pipeta, es muy eficaz en la prevención de la leishmaniosis canina en condiciones naturales de las áreas endémicas por su actividad repelente contra los flebótomos en un 95% (Otranto *et al.*, 2007).

Figura 35. Insecticidas tópicos en Spot on



(Fuente: Miró, 2008; Advantix, 2009; EXspot, 2009)

En zonas endémicas como en la cuenca mediterránea, el control de la Lcan mediante el uso de insecticidas tópicos esta basado principalmente en los siguientes productos:

Tabla 3. Insecticidas tópicos para el control de Lcan

PRESENTACIÓN	COLLARES	SPRAY	SPOT ON	SPOT ON
NOMBRE COMERCIAL	Scalibor (Intervet)	Duowin (Virbac)	EXspot (Schering Plough)	Advantix (Bayer)
CONCENTRACIÓN	40mg/g Deltametrin	Permetrin 18.8mg/ml + Piroxifen 0.2 mg/ml	2ml Permetrin	Permetrin 50% + Imidacloprid 10%
FUENTE	Killick-Kendrick <i>et al.</i> , 1997	Alvar, 2001	Alvar, 2001	Otranto <i>et al.</i> , 2007
Tiempo de protección	34 sem	3 sem	4 sem	4 sem
Grado de protección	96%	71.4%	92%	95%

15.4. Inmunopprofilaxis

Una vacuna eficaz contra la Lcan debería estimular principalmente una respuesta inmunitaria celular (Th1), sin embargo lograrlo se ha convertido en un objetivo complejo y difícil de alcanzar, López *et al.*, explican que es por las siguientes razones:

- Las infecciones parasitarias tienden a ser crónicas porque generan respuestas inmunitarias ineficaces en el hospedero, previniendo su eliminación y prolongando la infección en el tiempo.
- Los parásitos desarrollan con frecuencia estrategias de evasión de la respuesta inmune. En la infección por *Leishmania*, son destacables la supresión de los mecanismos leishmanicidas en el interior del macrófago, la inhibición de la presentación de antígenos o la infección de células sin capacidad leishmanicida.
- Los parásitos presentan ciclos biológicos más complejos que las bacterias o los virus, con diferentes fases biológicas que complican el desarrollo de una vacuna, *Leishmania* presenta dos fases en su ciclo biológico. Por lo que las parasitosis naturales provocan una pobre reacción inmunitaria, siendo difícil conseguir una respuesta inmune artificial por parte de una vacuna (López *et al.*, 2004).

A pesar de estas dificultades, existen casos en que las infecciones parasitarias confieren en el hospedero inmunidad frente a reinfecciones por el mismo parásito, en el caso de la leishmaniosis, la existencia de una población de perros infectados que desarrolla de manera natural una

respuesta inmunitaria protectora de control del parásito, los perros resistentes, indica que es posible forzar una respuesta inmunitaria eficaz mediante una vacuna. El desarrollo de dicha vacuna ha de seguir diferentes fases. Las pruebas preclínicas y ensayos de laboratorio con animales duran 3.5 años. Los ensayos clínicos de fase I evalúan la seguridad y dosificación duran 1.5 años. En los ensayos de fase II se evalúa la protección inducida por la vacuna ante una infección experimental duran 2 años y en la fase III se evalúa la eficacia de la vacuna en condiciones naturales, son los llamados estudios de campo que duran 3 años. Si la vacuna supera con éxito estas tres fases puede registrarse y comercializarse. Tras su comercialización, la vacuna entra en fase IV o farmacovigilancia, en que se realiza un seguimiento de la misma en las condiciones habituales de uso (López *et al.*, 2004; Todolí *et al.*, 2008).

15.4.1. Vacunas muertas o inactivadas

Para aumentar la respuesta inmunitaria en los macrófagos que tienen una respuesta defectuosa a las citoquinas se usa agentes inmunoestimuladores no específicos, como el BCG que son preparaciones liofilizadas de una cepa de *Mycobacterium bovis* atenuada en el laboratorio. El aluminio es otro adyuvante que muestra inmunogenicidad y eficacia limitada. También el monofosforil lípido A en aceite de escualeno es usado como adyuvante (O'Daly *et al.*, 1995, Roberts, 2006; Stuart *et al.*, 2008).

Los trabajos empezaron en 1940 en Brasil, luego Mayrink en 1970 creó una vacuna muerta compuesta de 5 aislados del parásito conteniendo 4 especies diferentes. En general, se considera que todos los ensayos basados en parásitos muertos son similares y se necesita un mejor adyuvante que el BCG para producir una vacuna efectiva (Khamesipour *et al.*, 2006; Stuart *et al.*, 2008).

Organismos muertos de *Leishmania* mezclados con una baja concentración de BCG como adyuvante ha experimentado las fases de ensayo I, II, III para inmunización en perros con éxito limitado (OIE, 2008).

15.4.2. Vacunas vivas clásicas

La única estrategia de vacunación usada con relativo éxito, estuvo limitada a la LC, desde hace 2000 años la "leishmanización" consistió en la inoculación de parásitos vivos mediante escarificación, en sitios estéticamente aceptables, a partir de raspados de una lesión activa (Piscopo y Mallia, 2006). Hasta los años 80, se han vacunado cerca de 2 millones de personas utilizando promastigotes en la población en general y soldados desplazados a zonas endémicas del medio Oriente, aproximadamente el 50% de los que recibieron la vacuna desarrollaron lesiones cutáneas, y de éstos, 93% fueron positivos a la prueba de hipersensibilidad retardada. Murieron 14% del grupo no vacunado y 2.5% en el grupo vacunado (Khamesipour *et al.*, 2006; Roberts,

2006). El principal inconveniente de la “leishmanización” es el riesgo de desarrollar la enfermedad a partir del sitio de la lesión, por lo que esta práctica ha quedado obsoleta (Piscopo y Mallia, 2006).

15.4.3. Vacunas vivas recombinantes

Tras décadas de investigaciones, se han obtenido dos vacunas formuladas con fracciones purificadas del parásito, que mostraron buenos resultados en los ensayos de fase III. La primera vacuna contra la Lcan registrada y comercializada en Brasil y en fase de registro en Europa tiene por nombre “Leishmune” y es distribuida por “Fort Dodge Animal Health Brazil” (Meeusen *et al.*, 2007).

Consiste en una fracción purificada de *L. donovani*, la fucosa manosa ligando (FML) que está presente en la superficie del parásito durante todo el ciclo biológico y es un potente inmunogénico, tiene como principal componente a la hidrolasa de nucleótidos NH36 (enzima importante en el inicio de la infección, al fragmentar nucleótidos y liberar bases púricas que el parásito necesita para la síntesis de ADN y la multiplicación en el hospedero) (Khamesipour *et al.*, 2006; Todolí *et al.*, 2008).

La formulación de FML administrada con QuilA saponina como adyuvante, muestra en estudios de campo cerca de 80% de protección clínica, brinda protección por 12 meses (Khamesipour *et al.*, 2006, Roberts, 2006; OIE, 2008). Sólo es recomendada para perros saludables seronegativos a la mínima edad de 4 meses. Es bien tolerada aunque algunos perros tienen reacciones adversas como dolor en el sitio de inoculación, anorexia, apatía, vómitos y diarrea. Sin embargo es muy importante remarcar que esta vacuna protege contra la aparición de signos pero no es eficaz en la prevención de la infección y la progresión de la enfermedad en perros (Dantas, 2008).

Figura 36. Vacuna contra la Lcan



(Fuente: Leishmune®, 2009)

Otra vacuna que ha obtenido ya el registro sanitario “Leishtec” también fue desarrollada en Brasil. En Francia, además, existe una vacuna en fase III de desarrollo con elevados grados de protección en estudios de campo el LiESAp-MDP (LiESAp: *L. infantum* excreted secreted antigens from promastigotes), con antígeno excretado y secretado obtenido a partir del sobrenadante de

cultivos de promastigotes de *L. infantum* y posteriormente purificado se administra junto con el adyuvante muramil dipéptido (MDP). Ha mostrado una eficacia del 92% y protección por 24 meses en estudios experimentales (Diniz *et al.*, 2008; Todolí *et al.*, 2008).

Las candidatas como antígenos recombinantes que demostraron inmunogenicidad en caninos son “*Leishmania* and thiol-specific antioxidant” (TSA), “elongation and initiation factor” (LeIF), y “*L. major* stress inducible protein 1” (LmSTI1), LACK, KMP11, CPA+CPB de la familia de las cisteínas y la trifusión de proteínas a partir de TSA, LeIF y LmSTI1 llamada Leish-111f usada como un multiantígeno en modelos animales (Khamesipour *et al.*, 2006; Roberts, 2006; Salay *et al.*, 2007; Stuart *et al.*, 2008; Chandra *et al.*, 2009).

Al menos 10 antígenos recombinantes han sido usados para proteger a ratones contra LC incluyen gp63, gp46, gp42, LACK y HSP70 que mostraron eficacia, pero solo por corto tiempo (Sacks *et al.*, 2002).

15.5. Etapas del control

Tiene como fin la reducción del número de casos de leishmaniasis visceral humana mediante la disminución de la prevalencia canina, por lo que el diagnóstico precoz de la Lcan es utilizado como medida de control para reducir la transmisión de los reservorios al hombre (Romero *et al.*, 2008). Una campaña de control de la leishmaniasis se compone de cuatro etapas:

15.5.1. Fase de preparación

El diagnóstico precoz y tratamiento adecuado de los casos a través de captación activa de casos probables en áreas donde se presenten altas tasas de morbilidad, para ello la primera fase de recogida de datos exige el conocimiento exhaustivo de la situación epidemiológica, se debe visitar casa por casa, deben participar tanto el personal de salud, los agentes comunales de salud, y personal de otras instituciones (Guthmann *et al.*, 1998).

La evaluación de la situación se puede hacer mediante una encuesta con leishmanina, IFI, ELISA, DAT y procurar la confirmación parasitológica. Para lo cual se debe contar con personal capacitado que ofrezca una atención cálida (MINSA, 2000).

15.5.2. Fase de ataque

a) Reducción vectorial químico: Fumigación

Se debe utilizar únicamente en casos de epidemias en medios urbanos y periurbanos (OPS, 1996). La aplicación de insecticidas contra los vectores resulta práctica en zonas donde exista transmisión intradomiciliar o peridomiciliar, debido a las características peri domésticas de *Lu. longipalpis*, esta situación es característica cuando hay presencia de casos en menores de 4 años. Por lo que se debe realizar la fumigación de la vivienda en los puntos de entrada de los

flebótomos, ventanas, puertas y alrededores, que debe incluir los criaderos potenciales del vector. Y debido a que las hembras de *Lu. longipalpis* pueden alimentarse de sangre de aves no olvidar fumigar los gallineros (MINSa, 2000; Lainson y Rangel, 2005; Diniz *et al.*, 2008).

Según el Ministerio de Salud peruano la elección del grupo de insecticidas que pueden ser utilizados debe obedecer al siguiente orden:

a) Para el tratamiento residual: piretroides, carbamatos, organofosforados y organoclorados.

b) Para tratamiento espacial: organofosforados y los piretroides. Los brotes en localidades rurales requerirán de la aplicación de fumigación peridomiciliar espacial.

Las acciones de control vectorial químico esta bajo la responsabilidad del Programa de Control de Malaria y Otras Enfermedades Metaxénicas en coordinación con la Dirección General de Salud Ambiental y son programadas anualmente (MINSa, 2000).

El rociado deberá ser realizado por personal con experiencia, respetando las normas generales de bioseguridad para sí mismo y para los pobladores, y específicas de acuerdo al producto utilizado y las indicaciones del fabricante. Se puede utilizar una bomba de aspersión tipo Hudson a presión constante con flujo en abanico menor o igual a 900 ml/minuto (Misionesalud, 2005).

En Brasil se ha usado el DDT (1.5 grams/m²), la fumigación debe extenderse a 200 metros alrededor de las residencias cuando un caso humano o canino se ha reportado (Palatnik *et al.*, 2001).

La OMS define la resistencia de los insectos frente a los insecticidas como una característica heredada que otorga una mayor tolerancia a un plaguicida o grupo de plaguicidas, de tal modo que los individuos resistentes sobreviven a una concentración del compuesto (o compuestos) que normalmente sería mortal para la especie, el criterio usado es mortalidad menor del 80% (MINSa, 2002b).

b) Eutanasia

La Organización Mundial de la Salud recomienda el sacrificio de los perros infectados por *L. infantum*, pero a la vez reconoce lo difícil de llevar a término esta medida. Con la excepción del oeste de China, donde tanto la leishmaniasis humana como la canina se consiguieron erradicar mediante la combinación de rociamiento intradomiciliario de insecticida y sacrificio de todos los perros seropositivos, los resultados del resto de campañas de control en países como Brasil, han resultado sólo parcialmente exitosas, a pesar de haber sacrificado más de 250 000 perros (en promedio 23 000 perros son eliminados anualmente) (Palatnik *et al.*, 2001; Madeira *et al.*, 2006; Piscopo y Mallia, 2006; Diniz *et al.*, 2008).

El sacrificio se basa en la positividad de las pruebas serológicas, independientemente de la condición general o la presencia de signos de Lcan (Schallig *et al.*, 2004; Madeira *et al.*, 2006). En

Brasil la vacuna aprobada por el Ministerio de Agricultura no previene la LV humana por lo que el Ministerio de Salud establece la eliminación de animales seropositivos (Diniz *et al.*, 2008).

Los programas de eliminación de perros positivos están siendo cuestionados en sus fundamentos lógicos y teóricos. Las razones son:

- Alto número de perros que no se incorporan al programa de control. Los perros asintomáticos, que son la mitad de los infectados y los perros vagabundos (Schallig *et al.*, 2004)
- Las pruebas diagnósticas que pretenden identificar a los perros infectados para su sacrificio, no son absolutamente sensibles. Esto mantiene al reservorio de la enfermedad en el área endémica (Palatnik *et al.*, 2001; Mazloumi *et al.*, 2002).
- Los animales que resultan positivos a *Leishmania* son identificados mucho tiempo después de ser infectados, y el tiempo entre encuestas, diagnóstico y sacrificio de animales es largo (6 meses en Brasil) (Mazloumi *et al.*, 2002).
- Los dueños rápidamente reemplazan sus perros con cachorros, los cuales son susceptibles a infectarse (Mazloumi *et al.*, 2002).
- Muchos dueños no acatan las medidas de control basadas en la eliminación de sus mascotas (Mazloumi *et al.*, 2002).

15.4.3. Fase de consolidación

Cuando deja de haber casos autóctonos; si apareciera alguno, se vuelve a la fase de ataque. Las medidas de presión deben continuarse durante todo este tiempo y han de prolongarse mientras pueda haber reservorios parasitados, es decir, varios años (Alvar, 2001).

15.4.4. Fase de mantenimiento

Cuando ya no hay reservorios parasitados pero el área sigue siendo vulnerable y receptiva pues hay vertebrados capaces de infectarse y flebótomos capaces de transmitir. La vigilancia es sólo pasiva, pero los laboratorios no deben dismantelarse. La erradicación se alcanza cuando pasan dos años desde la fase de mantenimiento sin casos humanos ni reservorios parasitados (Alvar, 2001).

III. CONCLUSIONES

- Los hallazgos laboratoriales más constantes en la leishmaniasis canina son anemia no regenerativa, hiperproteinemia, uremia, proteinuria y trombocitopenia.
- La evaluación del proteinograma permite evaluar la efectividad del tratamiento.
- Es importante evaluar si hay una enfermedad renal asociada, mediante el urianálisis y la al determinación de urea y creatinina.
- Los animales asintomáticos pueden representar más del 50% del total de perros infectados, en ellos las pruebas serológicas tienen baja sensibilidad, por lo que la PCR es confirmatoria.
- Las muestras que se emplean para realizar el frotis de la lesión, histopatología y PCR según su orden decreciente de sensibilidad son: médula ósea, ganglio linfático, piel y sangre.
- El grado de infectividad de un perro, la carga parasitaria y el nivel de anticuerpos se encuentran correlacionados.
- Un tratamiento exitoso no está asociado con la eliminación de parásitos, solo logra disminuir los títulos de anticuerpos, restaurar la positividad a la IDR y una mejoría clínica.
- La eutanasia obligatoria de todos los perros seropositivos ha demostrado que no es una medida de control efectiva.
- Es necesario considerar la eutanasia cuando los perros infectados conviven con personas inmunodeprimidas con riesgo concreto, y en aquellos que a la vez tienen enfermedad renal sin posibilidades de tratamiento.
- La leishmaniasis canina es un buen indicador de la transmisión de leishmaniasis porque el perro sirve de hospedero centinela y muestra el riesgo para la población humana susceptible.

IV. RECOMENDACIONES

- Debido a que el tratamiento es prolongado, produce efectos secundarios y puede generar resistencia de las drogas, es necesario elegir el protocolo de tratamiento más adecuado.
- Los perros deben pasar la noche en el interior de las viviendas para así evitar las horas de mayor actividad del vector.
- La vacuna deben acompañarse de otras medidas preventivas como los collares impregnados con deltametrin para aumentar el grado de protección en el animal.
- Se debe brindar al propietario de canes infectados información clara de la enfermedad. Es zoonótica siempre que este presente el vector. Solo podremos proporcionar una recuperación clínica y calidad de vida. Y se requiere monitorización exhaustiva.
- Debe instaurarse un sistema de vigilancia de la susceptibilidad y resistencia de los vectores de *Leishmania* a los insecticidas usados en el país.

V. BIBLIOGRAFÍA

1. **Advantix. 2009.** Barcelona: Bayer. [Internet], [12 julio 2009]. Disponible en: <http://www.advantix.es>
2. **Acha P, Szyfres B. 2003.** Zoonosis y Enfermedades transmisibles comunes al hombre y a los animales. Vol III. Parasitosis. 3ª ed. Organización Panamericana de la Salud. Publicación Científica y Técnica N° 580. EUA. 52-71p.
3. **Adamama KM, Rallis TS, Koytinas AF, Tontis D, Plevraki K, Kritsepi M. 2007.** Asymptomatic colitis in naturally infected dogs with *Leishmania infantum*: a prospective study. *Am J Trop Med Hyg* 76(1):53-57.
4. **Alvar JE. 2001.** Las Leishmaniasis: de la Biología al Control. 2ª ed. Salamanca: Laboratorios Intervet. 200p.
5. **Ampuero J, Urdaneta M, de Oliveira MV. 2005.** Factores de riesgo para la transmisión de leishmaniasis cutánea en niños de 0 a 5 años en un área endémica de *Leishmania (Viannia) braziliensis*. *Cad. Saúde Pública, Rio de Janeiro* 21(1):161-170.
6. **Aresu L, Valenza F, Ferroglio E, Pregel P, Uslenghi P, Tarducci A, Zanatta R. 2007.** Membranoproliferative glomerulonephritis type III in a simultaneous infection of *Leishmania infantum* and *Dirofilaria immitis* in a dog. *J Vet Diagn Invest* 19:569-572.
7. **Baneth G, Jaffe Ch. 1999.** Canine visceral leishmaniasis in Israel: an overview of an emerging disease with reference to wild canids and human infection. En: *Canine leishmaniasis: an update. Proceedings of the International canine forum.* Spain: Hoechst Roussel Vet.
8. **Baneth G. 2002.** A review of the treatment of canine leishmaniasis. En: *Canine leishmaniasis: moving towards a solution. Proceedings of the Second International Canine Leishmaniasis Forum.* Spain: Intervet.
9. **Baneth G. 2006.** Leishmaniasis. En: Greene GE, ed. *Infectious diseases of the dog and cat.* 3ª ed. United State: Saunders-Elsevier. p 685-698.
10. **Baneth G. 2007.** Leishmaniasis: a global zoonosis. En: *Proceedings of the World ASAVA.* Australia: Australian Small Animal Veterinary Association.

11. **Baneth G, Koutinas AF, Solano-Gallego L, Bourdeau P, Ferrer L. 2008.** Canine leishmaniosis – new concepts and insights on an expanding zoonosis: part one. *Trends in Parasitology* 24(7):324-330.
12. **Bañuls AL, Jonquieres R, Guerrini F, Le Pont F, Barrera C, Espinel I, Guderian R, Echeverria R, Tibayrenc M. 1999.** Genetic analysis of *Leishmania* parasites in Ecuador: Are *Leishmania* (*Viannia*) *Panamensis* and *Leishmania* (*V.*) *guyanensis* distinct taxa?. *Am J Trop Med Hyg* 61(5):838-845.
13. **Barreto M, Burbano M, Barreto P. 1997.** Nuevos registros de flebotominos (Diptera: Psychodidae) y triatominos (Hemiptera: Reduviidae) para Risaralda, Cauca y Valle del Cauca, Colombia. *Rev Colombia Med* 28(3):116-122.
14. **Barreto M, Burbano M, Barreto P. 2006.** Registros de *Lutzomyia* (Diptera: Psychodidae) en nuevas localidades de Colombia. *Rev Colombia Med* 37(1):39-45.
15. **Boehme CC, Hain U, Novosel A, Eichenlaub S, Fleischmann E, Löscher T. 2006.** Congenital visceral leishmaniasis. *Emerging Infection Disease* [Internet], [10 noviembre 2008]. Disponible en: <http://www.cdc.gov/eid>
16. **Bonilla DE. 2005.** Respuesta inmune a la leishmaniasis: algo más que linfocitos T. *Rev Piel* 20(8):383-395.
17. **Borda EC, Rea MJ, Mosqueda LA. 2005.** Clasificación intrínseca y extrínseca de cepas que ocasionan la leishmaniasis tegumentaria Americana en la provincia de Corrientes, Argentina. *Comunicaciones Científicas y Tecnológicas UNNE M-142*:4.
18. **Bowman DD. 2007.** Spread of companion animal vector-borne parasitic disease in the US and Europe: concerns relative to travel, national disasters, shelter-source animals and wildlife. En: *Proceedings of the 2nd Canine vector-borne disease*. Italy: Bayer HealthCare.
19. **Breitschwerdt B. 2007.** Clinicians, causation and infectious disease. *IVIS* [Internet], [10 noviembre 2008]. Disponible en: <http://www.tnavc.org>
20. **Burstein Z. 1995.** Galería fotográfica Leishmaniasis tegumentaria en el Perú. *Folia Dermatológica Peruana*. 6(1):45.
21. **Cáceres AG, Galati E. 2001.** Lista de phlebotominae (díptera: Psychodidae) para el Perú y especies consideradas como vectores naturales e incriminadas en la transmisión de agentes patógenos de la leishmaniosis tegumentaria y la enfermedad de Carrión (verruca peruana). *Rev Med Exp* 18 (3-4):100-106.
22. **Chandra SG, Rani M, Dikhit MR, Akhtar WA, Das P. 2009.** Structural modeling, evolution and ligand interaction of KMP 11 protein of different *Leishmania* strains. *J Comput Sci Syst Biol* 2(2):147-158.
23. **Cannova DC. 2007a.** Técnicas de caracterización de *Leishmania* spp y su aporte en la leishmaniasis. *Rev Salus* 11(1):67-72p.

24. **Cannova DC, Cañate R, Castillo L, Cruces M, Zambrano G; Simons MI. 2007b.** Evaluación del antígeno recombinante K39 para el serodiagnóstico de leishmaniasis visceral mediante ensayo inmunoenzimático (ELISA). *Rev Salus* 11(3):26-29p.
25. **Capelli G. 2007.** Asymptomatic and symptomatic dogs in endemic areas, their role in the epidemiology of canine leishmaniasis. En: *Proceedings of the 2nd Canine vector-borne disease*. Italy: Bayer HealthCare.
26. **Castagnaro M, Crotti A, Fondati A, Gradoni L, Lubas G, Maroli M, Oliva G, Paltrinieri S, Solano-Gallego L, Roura X, Zatelli A, Zini E. 2007.** Canine leishmaniasis: guidelines for diagnosis, staging, therapy, monitoring and prevention. En: *Canine Leishmaniasis Working Group*. Italy: Hill's Italia.
27. **Castro SG, Zerpa OR, Rondón AL. 2003.** Leishmaniasis en la infancia. *Med Cutan Iber Lat Am* 31(6):351-361.
28. **CDC. 2007a.** Prevention of specific infectious diseases: Leishmaniasis. [Internet], [10 noviembre 2008]. Disponible en: http://www.cdc.gov/ncidod/dpd/parasites/leishmania/factsht_%20leishmania.htm.
29. **CDC. 2007b.** Manufacturers of drugs used to treat parasitic infections. [Internet], [10 noviembre 2008]. Disponible en: http://www.medicalletter.org/parasitic_cdc
30. **CFSPH. 2004.** Iowa: Center for Food Security and Public Health. [Internet], [10 noviembre 2008]. Disponible en: Web: http://www.cfsph.iastate.edu/ LESH_H0604
31. **Ciaramella P, Corona M. 2003.** Canine Leishmaniasis: Therapeutic Aspects. *Rev Compendium* 25(5):370-375.
32. **Chappuis F, Sundar S, Hailu A, Ghalib H, Rijal S, Peeling RW, Alvar J, Boelaert M. 2007.** Visceral leishmaniasis: what are the needs for diagnosis, treatment and control. *Rev Nature* 5:7-16.
33. **Cochero S, Anaya Y, Díaz Y, Paternina M, Luna A, Paternina L, Bejarano E. 2007.** Infección natural de *Lutzomyia cayennensis cayennensis* con parásitos tripanosomatídeos (Kinetoplastida: Trypanosomatidae) en los Montes de María, Colombia. *Rev Cubana Med Trop* 59(1):211-212.
34. **Collins CJ. 2008.** Microsoft® Student Enciclopedia Encarta 2008 [CD-ROM]. Washington: Microsoft Corporation 2007.
35. **Cortés L. 2006.** Foco de leishmaniasis en el Hobo, Municipio de El Carmen de Bolívar, Bolívar, Colombia. *Rev Biomédica* 26(Suppl.1):236-241.
36. **Costa MM, Lima WG, Figueiredo MM, Michalick MS, Tafuri WL. 2008.** Cervical, mandibular, and parotid lymph nodes of dogs naturally infected with *Leishmania infantum*: A histopathologic and immunohistochemistry study and its correlation with facial skin lesions. *Vet Pathol* 45:613-616.

37. **Coura SX, Monteiro H, Hadad SM, Chiarelli I, Lima W, Marques MM, Tafuri WL. 2006.** Comparison of paraffin-embedded skin biopsies from different anatomical regions as sampling methods for detection of Leishmania infection in dogs using histological, immunohistochemical and PCR methods. *BMC Vet Research* 2(17) [Internet], [10 noviembre 2008]. Disponible en: <http://www.biomedcentral.com/1746-6148/2/17>
38. **Croft SL, Sundar S, Fairlamb AH. 2006.** Drug resistance in leishmaniasis. *Clinical Microbiol Rev* 19(1):111-126.
39. **Desjeux P. 2002.** Urbanisation of the leishmaniasis. En: *Canine leishmaniasis: moving towards a solution. Proceedings of the Second International Canine Leishmaniasis Forum.* Spain: Intervet.
40. **Dantas-Torres F. 2008.** Vector-borne diseases in Brazil. *Parasites & Vectors* 1(25) [Internet], [10 noviembre 2008]. Disponible en: <http://www.parasitesandvectors.com/content/1/1/25>
41. **Davies CR, Kaye P, Croft SL, Sundar S. 2003.** Leishmaniasis: new approaches to disease control. *British Med J* 326:377-381.
42. **Day MJ. 2007.** Immunoglobulin G subclass – distribution in canine leishmaniosis: what does it mean?. En: *Proceedings of the 2nd Canine vector-borne disease.* Italy: Bayer HealthCare.
43. **Dey A, Sharma P, Redhu N, Singh S. 2008.** Kinesin Motor Domain of Leishmania donovani as a Future Vaccine Candidate. *Clinical and Vaccine Immunology* 15(5):836-842.
44. **Diniz SA, Melo MS, Borges AM, Bueno R, Reis BP, Tafuri WL, Nascimento EF, Santos RL. 2005.** Genital lesions associated with visceral leishmaniasis and shedding of Leishmania sp. in the semen of naturally infected dogs. *Vet Pathol* 42:650-658.
45. **Diniz SA, Silva FL, Alcina V, Neta C, Bueno R, Rita M, Abreu A, Santos RL. 2008.** Animal reservoirs for visceral leishmaniasis in densely populated urban areas. *J Infect Developing Countries* 2(1):24-33.
46. **dos Santos IB, Miranda L, Okamoto T, Figueiredo F, Schubach T, Leme L, Quintella L, Tortelly R. 2008.** Leishmaniose tegumentar americana canina no Rio de Janeiro – revisão. *Rev Univ Rural* 28(1):27-38.
47. **Duo Leish/Ehrli. 2008.** Barcelona: DMV Laboratorios. [Internet], [12 enero 2008]. Disponible en: <http://www.dmv.es>
48. **Duprey Z, Steurer F, Rooney J. 2006.** Canine visceral leishmaniasis, United States and Canada 2000–2003. *Emerging Infectious Diseases* 12(3):440-446.
49. **ENY-738S. 2007.** Florida: Departamento de Entomología y Nematología, Servicio de Extensión Cooperativa de la Florida, Inst. Food Agric. Sci. Univ. Florida. [Internet], [12 november 2008]. Available: <http://edis.ifas.ufl.edu/ENY-738S>
50. **ENY-740S. 2007.** Florida: Departamento de Entomología y Nematología, Servicio de Extensión Cooperativa de la Florida, Inst. Food Agric. Sci. Univ. Florida. [Internet], [12 november 2008]. Available: <http://edis.ifas.ufl.edu/ENY-740S>

51. **EXspot. 2009.** Madrid: Schering-Plough. [Internet], [12 julio 2009]. Disponible en: <http://www.sp-animalhealth.com>
52. **Festa CN, Guerra CA. 2006.** Uso de imiquimod en infantes. *Rev Dermatol Pediatr Lat* 4(3):232-239.
53. **Ferrer LM. 1999.** Clinical aspects of canine leishmaniasis. En: Canine leishmaniasis: an update. Proceedings of the International canine forum. Spain: Hoechst Roussel Vet.
54. **Ferrer LM. 2002.** The pathology of canine leishmaniasis. En: Canine leishmaniasis: moving towards a solution. Proceedings of the Second International Canine Leishmaniasis Forum. Spain: Intervet.
55. **Ferrer LM. 2009.** Tratamiento de la leishmaniosis canina: el protocolo HCV-UAB. En: Simposio de leishmaniosis ANCLIVEPA. Minas Gerais: Asociación de Clínicos Veterinarios de Pequeños Animales.
56. **Figueras MC, García MJ, Asensi FB, Velasco RB, Canals AB, Ausín IA. 2003.** Tratamiento de corta duración de la leishmaniasis visceral con anfotericina B liposómica en pacientes inmunocompetentes. *An Pediatr* 59(6):535-540.
57. **Gállego M, Riera C. 2007.** Barcelona: Facultat de Farmàcia, Universitat de Barcelona. [Internet], [12 agosto 2007]. Disponible en: <http://www.bvs.insp.mx/articulos/5/23/112001.htm>
58. **García AD. 2005.** Leishmaniasis cutánea. *Actas Dermosifiliogr* 96(1):15-38.
59. **García EQ, Azanza J, Sádaba B, Pérez J. 1998.** Antiparasitarios: antipalúdicos, antiprotozoarios, antihelmínticos y ectoparasiticidas. *Rev Med* 7(76):3533-3549.
60. **Gonçalves R, Vieira ER, Melo MN, Gollob KJ, Mosser DM, Tafuri WL. 2004.** A sensitive flow cytometric methodology for studying the binding of *L. chagasi* to canine peritoneal macrophages. *BMC Infectious Diseases* 5(39) [Internet], [8 noviembre 2008] Disponible en: <http://www.biomedcentral.com/1471-2334/5/39>
61. **González F, Zerpa O. 2004.** Leishmaniasis cutánea en la infancia. *Dermatol Pediatr Lat* 2(2):97-108.
62. **González C, Cabrera OL, Munstermann LE, Ferro C. 2006.** Distribución de los vectores de *Leishmania infantum* (Kinetoplastida: *Trypanosomatidae*) en Colombia. *Biomédica* 26 (Supl.1):64-72.
63. **Gradoni L. 2002.** The diagnosis of canine leishmaniasis. En: Canine leishmaniasis: moving towards a solution. Proceedings of the Second International Canine Leishmaniasis Forum. Spain: Intervet.
64. **Gruppo Leishmania. 2009.** Italia: Gruppo di Studio sulla Leishmaniosi Canina [Internet], [12 setiembre 2009]. Disponible en: <http://www.gruppoleishmania.org>
65. **Guthmann JP, Calmet J, Rosales E, Cruz M, Chang J, Dedet J. 1998.** Las asociaciones de pacientes y el control de la leishmaniasis en el Perú. *Pan Am J Public Health* 3(6):400-404.

66. **Hernández JR, Becker I. 2006.** Linfocitos T citotóxicos CD8+ en la leishmaniasis cutánea. Rev. Salud Pública de México 48(5):430-439.
67. **Herrer A. 1999.** La leishmaniasis tegumentaria en el alto Tambopata, Departamento de Puno, Perú. Rev Med Exp 15(1):15-24.
68. **Herrer A. 2004.** Subsistencia ocasional del patrón epidemiológico clásico de la uta (Leishmaniasis tegumentaria). Rev Med Exp salud pública 21(1):51-55.
69. **Huarcaya E, Leyva R, Llanos-Cuentas A. 2004.** Influence of climatic factors on infectious diseases. Rev Med Hered 15(4):218-224.
70. **Isaza D, Restrepo B, Arboleda M, Casas E, Hinestroza H, Yurgaqui Y. 1999.** La leishmaniasis: conocimientos y prácticas en poblaciones de la costa del Pacífico de Colombia. Pan Am J Public Health 6(3):177-184.
71. **IDEXX. 2008.** Barcelona: IDEXX Laboratorios. [Internet], [12 enero 2008]. Disponible en: <http://www.idexx.es>
72. **Kato H, Uezato H, Katakura K, Calvopiña M, Marco J, Barroso P, Gomez E, Mimori T, Korenaga M, Iwata H, Nonaka S, Hashiguchi Y. 2005.** Detection and identification of *Leishmania* species within naturally infected sand flies in the andean areas of Ecuador by a polymerase chain reaction. Am J Trop Med Hyg 72(1):87-93.
73. **Khamesipour A, Rafati S, Davoudi N, Maboudi F, Modabber F. 2006.** Leishmaniasis vaccine candidates for development: A global overview. Indian J Med Res 123(3):423-438.
74. **Killick-Kendrick R, Killick-Kendrick M, Focheux M, Dereure J, Puech M, Cadiergues MC. 1997.** Protection of dogs from the bites of phlebotomines and sandflies by deltamethrin collars for the control of canine leishmaniasis. Medical and Veterinary Entomology 11:105-111.
75. **Killick-Kendrick R, Killick-Kendrick M. 1999.** Biology of sand fly vectors of Mediterranean canine leishmaniasis. En: Canine leishmaniasis: an update. Proceedings of the International canine forum. Spain: Hoechst Roussel Vet.
76. **Killick-Kendrick R. 2002.** The life-cycles of *Leishmania* in the sand fly and transmission of leishmaniasis by bite. En: Canine leishmaniasis: moving towards a solution. Proceedings of the Second International Canine Leishmaniasis Forum. Spain: Intervet.
77. **Komnenou A, Koutinas AF. 2007.** Ocular manifestations of some canine infectious and parasitic diseases commonly encountered in the Mediterranean. EJCAP 17(3):271-279.

78. **Lainson R, Rangel EF. 2005.** *Lutzomyia longipalpis* and the eco-epidemiology of American visceral leishmaniasis, with particular reference to Brazil - A Review. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 100(8):811-827.
79. **Lamothé J. 1999.** Treatment of canine leishmaniasis from A (Amphotericin B) to Z (Zyloric®). En: Canine leishmaniasis: an update. Proceedings of the International canine forum. Spain: Hoechst Roussel Vet.
80. **Leishmune®. 2009.** Brazil: Fort Dodge Saúde Animal. [Internet], [10 noviembre 2008]. Disponible en: <http://www.leishmune.br/p-pdf>
81. **Lindsay SD, Zajac MA. 2002.** American foxhounds: an emerging zoonosis? *Compendium* 24(4):304-313.
82. **Lipoldová M, Demant P. 2006.** Genetic susceptibility to infectious disease: lessons from mouse models of leishmaniasis. *Nature Reviews* 7:294-305.
83. **López M, Mallorquín P, Pardo R. 2004.** Vacunas humanas de nueva generación. 1ª ed. España: Genoma España/CIBT-FGUAM.112p.
84. **Lucas MC, Franke DE, Cachay IM, Tejada A, Cruz EM, Kreutzer R, Barker D, McCann S, Watts D. 1998.** Geographic distribution and clinical description of leishmaniasis cases in Peru. *Am J Trop Med Hyg* 59(2):312-317.
85. **Madeira MF, Schubach A, Schubach TM, Pacheco RS, Oliveira FS, Pereira SA, Figueiredo FB, Baptista C, Marzochi MC. 2006.** Mixed infection with *Leishmania (Viannia) braziliensis* and *Leishmania (Leishmania) chagasi* in a naturally infected dog from Rio de Janeiro, Brazil. *Am J Trop Med Hyg* 100:442-445.
86. **Marco JD, Barroso PA, Calvopiña M, Kumazawa H, Furuya M, Korenaga M, Cajal SP, Mora MC, Rea M, Borda CE, Basombrío MA, Taranto NJ, Hashiguchi Y. 2005.** Species assignation of *Leishmania* from human and canine tegumentary leishmaniasis cases by multilocus enzyme electrophoresis in north Argentina. *Am J Trop Med Hyg* 72(5):606-611.
87. **Marques MI. 2008.** Leishmaniose Canina: Tesis de Mestrado em Medicina Veterinária. Lisboa: Univ Técnica de Lisboa. 150
88. **Martínez SS, Ceron JJ. 2005.** Evaluation of acute phase protein indexes in dogs with leishmaniasis at diagnosis, during and after short-term treatment. *Vet Med Czech* 50(1):39-46.
89. **Martínez B, Berzunza M, Becker I. 2008.** El ADN de *Leishmania mexicana* activa al macrófago murino e induce aumento en la expresión de TLR9. *Gac Méd Mex* 144(2):99-104.
90. **Mazloui AG, Hodjati MH, Mohite H, Davies CR. 2002.** Effect of insecticide-impregnated dog collars on incidence of zoonotic visceral leishmaniasis in Iranian children: a matched cluster randomised trial. *The Lancet* 360:374-379.
91. **Medina GR. 2002.** Infección por *Leishmania* sp. En caninos del distrito de Pampas grande, Ancash. Tesis de Médico Veterinario. Lima: Univ. Nac. Mayor de San Marcos. 48 p.

92. **Meeusen N, Walker J, Peters A, Pastoret P, Jungersen G. 2007.** Current Status of Veterinary. *Clinical Microbiol Rev* 20(3):489–510.
93. **Mesa AV, Molano PM, Seon B, Figadere B, Robledo SM, Muñoz DL, Sáez JV. 2008.** Síntesis y actividades leishmanicida y citotóxica in vitro de análogos 2-arilquinolinas. *VITAE* 15(2):259-266.
94. **Mettler MF, Grimm F, Capelli G, Camp H, Deplazes P. 2005.** Evaluation of Enzyme-Linked Immunosorbent Assays, an Immunofluorescent-Antibody Test, and two rapid tests (Immunochromatographic-Dipstick and Gel Tests) for serological diagnosis of symptomatic and asymptomatic *Leishmania* infections in dogs. *J Clin Microbiol* 43(11):5515-5519.
95. **Miles SA, Conrad SM, Alves RG, Jeronimo SM, Mosser DM. 2005.** A role for IgG immune complexes during infection with the intracellular pathogen *Leishmania*. *J Exp Med* 201(5):747-754.
96. **Milleron RS, Mutebi J, Valle S, Montoya A, Yin H, Soong L, Lanzaro GC. 2004.** Antigenic diversity in maxadilan, a salivary protein from the sand fly vector of american visceral leishmaniasis. *Am J Trop Med Hyg* 70(3):286-293.
97. **Milteforan®. 2007.** Francia: Virbac. [Internet], [10 noviembre 2008]. Disponible en: <http://www.virbac.es/p-virbacespubes>
98. **Minaya G, Torres Y, Fafán M, Mendizabal L. 1999.** Evaluación de la intradermorreacción con antígenos de *Leishmania (Viannia) peruviana* y *Leishmania (Viannia) braziliensis* en áreas endémicas de leishmaniasis en el Perú. *Rev Med Exp* XV (1-2):5-14.
99. **Minaya G, Arroyo E, Vargas J, Gonzáles A. 2002.** La prueba intradérmica de Montenegro (IDR) en pacientes con enfermedad de Chagas: observación preliminar. *Rev Perú Med Exp* 19(3):146-148.
100. **Minero M, Chinchilla M, Guerrero O, Castro A. 2004.** Infección de fibroblastos de piel de animales con distinto grado de susceptibilidad a *Leishmania infantum* y *Leishmania mexicana* (Kinetoplastida: Trypanosomatidae). *Rev Biol Trop* 52(1):261-267.
101. **Misionesalud. 2005.** Argentina: Ministerio de Salud Pública Argentina. [Internet], [10 octubre 2008]. Disponible en: <http://www.misiones-gov-ar/salud>
102. **[MINSA] Ministerio de Salud. 1997.** Manual de procedimientos laboratorios para el diagnóstico de la leishmaniasis. Lima: MINSA. Serie de normas técnicas N° 13. 55p.
103. **[MINSA] Ministerio de Salud. 2000.** Leishmaniasis. Lima: MINSA. Serie Documentos Monográficos N°8. 80p.
104. **[MINSA] Ministerio de Salud. 2002a.** Distribución de los principales insectos vectores de enfermedades en el Perú. Enfermedades Emergentes y Reemergentes. Lima: Documento Técnico N° 4. 41p.

105. **[MINSA] Ministerio de Salud. 2002b.** Susceptibilidad de los vectores de Malaria a los insecticidas en el Perú. Enfermedades Emergentes y Reemergentes. Lima: Documento Técnico N° 5. 49p.
106. **[MINSA] Ministerio de Salud. 2002c.** Manual de procedimientos de identificación de vectores de leishmaniosis y enfermedad de Carrión. Lima: Serie de Normas Técnicas N° 36. 41p.
107. **[MINSA] Ministerio de Salud. 2005a.** Evaluación de la especificidad de la leishmanina (prueba intradérmica de Montenegro) en pacientes con la Enfermedad de Chagas. Lima: MINSA. Informe Técnico N° 35. 6p.
108. **[MINSA] Ministerio de Salud. 2005b.** Incriminación de *Lutzomyia spp.* como vector de patógenos de las leishmaniosis en el Departamento de Puno. Lima: MINSA. Serie informes técnicos N°42. 14p.
109. **Ministério da Saúde; Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. 2008.** Portaria Interministerial N° 1.426. Diário Oficial da União 133:37.
110. **Miranda H, Rodríguez F, Chafloque M. 2006.** Leishmaniosis: clinical forms and cutaneous varieties in andean areas of the region La Libertad. Folia Dermatol 17(2):29-33.
111. **Miró GC. 2007a.** Leishmaniosis canina: situación actual en Europa, diagnóstico y control. Acta scientiae veterinariae 35(Suppl.2):227-229.
112. **Miró GC. 2007b.** Leishmaniosis canina y felina. 1ª ed. Madrid: Acalanthis Comunicación y Estrategias. 126p.
113. **Miró GC. 2008.** Diseases canine leishmaniosis: ¿Is everything “Under Control”? En: 6th Merial symposium on parasitosis & arthropod borne. Tunis: Merial
114. **Montalvo A, Alberti E, González M. 2001.** Construcción de una biblioteca genómica de *Leishmania amazonensis* y su expresión en músculo de ratones BALB/c. Rev Cubana Med Trop 53(3):154-160.
115. **Niedewieser I. 2004.** *Leishmania infantum*: molecular analysis for identification of potential virulence factors and genes of diagnostic use. En: Inauguraldissertation Philosophisch Naturwissenschaftlichen Fakultät. Basel: Fakultät der Universität Basel.
116. **Nieves E, Pimenta PF. 2002.** Influence of vertebrate blood meals on the development of *Leishmania (Viannia) braziliensis* and *Leishmania (Leishmania) amazonensis* in the sand fly *Lutzomyia migonei* (diptera: Psychodidae). Am J Trop Med Hyg 67(6):640-647p.
117. **Nimri L, Soubani R, Gramiccia M. 2002.** *Leishmania* species and zymodemes isolated from endemic areas of cutaneous leishmaniasis in Jordan. Kinetoplastid Biology and Disease 1(7) [Internet], [10 noviembre 2008]. Disponible en: <http://www.kinetoplastids.com/content/1/1/7>
118. **Noli Ch. 1999.** Canine leishmaniasis. Rev. Waltham Focus 9(2):16-24.

119. **Nuñez, SE. 2007.** Manejo Integrado de Plagas con fundamento ecológico MIPE y el Control Biológico de vectores. En: Avances en el diagnóstico tratamiento y control de las enfermedades parasitarias prevalentes en el Perú. Lima: SENASA.
120. **O'Daly JA, Spinetti H, Rodríguez M, Acuña L, Castillo L, Zambrano L, Ovalles T, Zamora C. 1995.** Comparación de los efectos terapéuticos de la mezcla de promastigotes + BCG, antígenos purificados de amastigotes y el glucantime® en un área endémica de leishmaniasis cutánea, en Guatire, Edo. Miranda, Venezuela. Gac Méd Caracas 103(4):327-357.
121. **Otranto D, Paradies P, Sasanelli M, Spinelli R, Brandonisio R. 2004.** Rapid immunochromatographic test for serodiagnosis of canine leishmaniasis. J Clin Microbiol 42(6):2769-2770.
122. **Otranto D, Paradies P, Sasanelli M, Leone N, Caprariis D, Chirico J, Spinelli R, Capelli G, Bradonisio O. 2005.** Recombinant K39 dipstick immunochromatographic test: a new tool for the serodiagnosis of canine leishmaniasis. J Vet Diagn Invest 17:32-37.
123. **Otranto D, Paradies P, Paolo R, Latrofa M. 2007.** Efficacy of a combination of 10% imidacloprid / 50% permethrin for the prevention of leishmaniasis in kennelled dogs in an endemic area. Science Direct Ve. Parasitology 144:270-278.
124. **OIE. 2004.** Iowa: Office International des Epizooties. [Internet] [10 noviembre 2008]. Disponible en: http://www.oie.int/esp/normes/mmanual/pdf_es/2.2.11_Leishmaniosis.pdf
125. **OIE. 2008.** Iowa: Office International des Epizooties. [Internet] [10 noviembre 2008]. Disponible en: http://www.oie.int/eng/normes/mmanual/2008/pdf/2.01.08_LEISHMANIOSIS.pdf
126. **Oliva G. 2007.** Canine leishmaniosis and concurrent infection with other vector-pathogens in southern Italy. En: Proceedings of the 2nd Canine vector-borne disease. Italy: Bayer HealthCare.
127. **[OMS] Organización Mundial de la Salud. 2006.** Control de la leishmaniasis. Ginebra: OMS. Recomendaciones del Consejo Ejecutivo en la 118ª reunión. 3p.
128. **[OMS] Organización Mundial de la Salud. 2007.** Control de la leishmaniasis. Ginebra: OMS. Informe de la secretaria en la 60ª Asamblea Mundial de la Salud. 5p.
129. **[OMS] Organización Mundial de la Salud. 2007.** Control de la leishmaniasis. Ginebra: OMS. Informe de la secretaria en la 60ª Asamblea Mundial de la Salud. 5p.
130. **[OMS] Organización Mundial de la Salud. 2008.** Update of American Trypanosomiasis and Leishmaniasis Control and Research: Final Report. Rio de Janeiro: OMS. Serie de Informes Técnicos 512. 176p.
131. **OMS. 2009.** Geneva: Organización Mundial de la Salud. [Internet], [12 julio 2009]. Disponible en: http://www.who.int/neglected_diseases/integrated_media_leishmaniasis/en/index.html

132. **[OPS] Organización Panamericana de la Salud. 1996.** Epidemiología y control de la Leishmaniasis en las Américas, por país o territorio. Washington, D.C: OPS. Cuaderno Técnico N° 44. 63p.
133. **[OPS] Organización Panamericana de la Salud. 2005.** El control de las enfermedades transmisibles. Washington, D.C: OPS. Publicación científica y técnica N° 613. 402-410p.
134. **OPS. 2007.** Washington: Organización Panamericana de la Salud. [Internet] [10 noviembre 2008]. Disponible en: <http://www.ops.leishmaniasis>
135. **Orué A, Abreu NY, Martínez C, Mendoza AL. 2008.** Identificación de una secuencia de ADN genómico de *Leishmania* específica del subgénero *Leishmania*. Rev. de la Soc. Venezolana de Microbiol 28:6-13.
136. **Oshaghi MA, Yaghobi-Ershadi MR, Abbassi M, Parvizi P, Akhavan AR, Rahimi A, Zahraei AR, Rassi Y, Mohtarami F. 2008.** Detection of *Leishmania major* in naturally infected sand flies using semi nested-PCR. Iranian J Publ Health 37(4):59-64.
137. **Owens SD, Oakley D, Marryott K, Hatchett W, Walton R, Nolan T, Newton A, Steurer F, Schantz P, Giger U. 2001.** Transmission of visceral leishmaniasis through blood transfusions from infected English Foxhounds to anemic dogs. J Am Vet Med Assoc 219(8):1076-1083.
138. **Palatnik CD, dos Santos W, Franc JS, Teodoro RD, Barbosa AR, Palatnik M, Mayrink W, Genaro O. 2001.** Impact of canine control on the epidemiology of canine and human visceral leishmaniasis in Brazil. Am J Trop Med Hyg 65(5):510-517.
139. **Pereira A, Perez M. 2002.** Leishmaniosis. Rev. Offarm 21(9):116-124.
140. **Pérez J, Carrasco L. 2000.** Diagnóstico histopatológico de micosis en patología veterinaria. Rev Iberoam Micol 17:18-22.
141. **Pérez JV, Pérez JV, Castanys S, Gamarro F. 2007.** Estrategias terapéuticas y bases moleculares de la resistencia a fármacos frente a leishmaniasis. Biojournal.net [Internet], [28 noviembre 2007]. Disponible en: <http://www.biojournal.net/articulo.asp?id=26>
142. **Piscopo TV, Mallia AC. 2006.** Leishmaniasis. Postgrad Med J 82:649-657.
143. **Quintero G, Rodríguez AM. 2008.** Aspectos Epidemiológicos de la Leishmaniasis Visceral. Acta Científica Estudiantil 6(3):149-159.
144. **Ramírez MA, Ortega PS, Robledo SR. 2006.** Efecto de la interleuquina-1 y el factor de necrosis tumoral alfa en la inducción de la respuesta inmune adquirida durante la infección por *Leishmania (Viannia) panamensis*. Rev Médicas UIS; 19(4):250-265.
145. **Ramírez JL. 2008.** Linfoma multicéntrico en el perro: revisión a partir de dos casos clínicos. Rev Argos 99(6):38-40
146. **Cortadellas O, Chalmeta M. 2007.** Leishmaniosis, enfermedad renal crónica y adenitis sebácea en un perro mestizo. Rev Argos 89(6):34-36.

147. **Reithinger R, Davies CR. 1999.** Is the domestic dog (*canis familiaris*) a reservoir host of American Cutaneous leishmaniasis? A critical review of the current evidence. *Am J Trop Med Hyg* 61(4):530-541.
148. **Roberts MT. 2006.** Current understandings on the immunology of leishmaniasis and recent developments in prevention and treatment. *British Med Bull* 76:115-130.
149. **Romero MH, López MC, Echeverri MC, Rivas FA. 2008.** Canine Visceral Leishmaniasis: Diagnostic tests do not detect real state of the infection. *Rev Salud Pública* 10(2):290-298.
150. **Rondón A. 2006.** Visión actual y futuro de la leishmaniasis. *Med Cutan Iber Lat Am* 34(6):253-254.
151. **Rosa JR, Rea MJ, Borda EC. 2001.** *Lutzomyia (Nyssomyia) Intermedia* y *Lu. Migonei*, probables vectores de la leishmaniasis en la provincia de Corrientes, Argentina. *Comunicaciones Científicas y Tecnológicas de la UNNE*. 3p.
152. **Santos VC, Araujo RN, Machado LA, Pereira MH, Gontijo NF. 2008.** The physiology of the midgut of *Lutzomyia longipalpis* (Lutz and Neiva 1912): pH in different physiological conditions and mechanisms involved in its control. *J of Experimental Biol* 211:2792-2798.
153. **Scalibor. 2009.** Salamanca: Intervet. [Internet], [12 julio 2009]. Disponible en: <http://www.intervet.com>
154. **Sobrado SV, Szelag EA, Rosa JR. 2008.** Metodología de preparación de flebotominos (Diptera: *Psychodidae*) para el diagnóstico de infección de *Leishmania sp.* *Comunicaciones Científicas y Tecnológicas de la UNNE*. 3p.
155. **Roura X. 2006.** Actualización de las enfermedades infecciosas caninas transmitidas por garrapatas. En: 41 Congreso Nacional de Avepa. Madrid: Bayer Health Care.
156. **Roura X. 2007.** Exposure to arthropod-borne pathogens in healthy or infected dogs from Spain. En: Proceedings of the 2nd Canine vector-borne disease. Italy: Bayer HealthCare.
157. **Roura X. 2008.** Analítica sanguínea en donantes de sangre. *Rev Argos* 99(6):28-29.
158. **Sacks D, Belkaid Y, Mendez S, Kamhawi S, Seder R, Valenzuela J, Ribeiro J. 2002.** Perspectives for new vaccines against leishmaniasis. En: Canine leishmaniasis: moving towards a solution. Proceedings of the Second International Canine Leishmaniasis Forum. Spain: Intervet.
159. **Salay G, Dorta ML, Santos NM, Mortara RA, Brodskyn C, Oliveira CI, Barbiéri CL, Rodrigues MM. 2007.** Testing of four *Leishmania* vaccine candidates in a mouse model of infection with *Leishmania (Viannia) braziliensis*, the main causative agent of cutaneous leishmaniasis in the New World. *Clin Vaccine Immunol* 14(9):1173-1181.
160. **Salomon OD, Sosa SE, Dri L, Donnet M, Galarza R, Recalde H, Tijera A. 2002.** Leishmaniosis tegumentaria en las Lomitas, provincia de Formosa Argentina, 1992-2001. *Rev. Medicina* 62(6):562-568.

161. **Salomón OD. 2008.** Eco-epidemiología de la leishmaniasis visceral en Argentina. En: III Congreso Latinoamericano de Zoonosis - VI Congreso Argentino de Zoonosis. Buenos Aires: Centro Nacional de Diagnóstico e Investigación de Endemo-epidemias.
162. **Sanchez MA, Diaz NL, Zerpa O, Negron E, Conit J, Tapia FJ. 2004.** Organ-specific immunity in canine visceral leishmaniasis: analysis of symptomatic and asymptomatic dogs naturally infected with *Leishmania chagasi*. Am J Trop Med Hyg 70(6):618-624.
163. **Sánchez ER, Altet L, Sanchez A, Francino O. 2005.** Polymorphism of Slc11a1 (Nramp1) gene and canine leishmaniasis in a case-control study. J Hered 96:755-758.
164. **Santos GG, Campino L, Abranches P. 2000.** Canine experimental infection: Intradermal inoculation of *Leishmania infantum* promastigotes. Mem Inst Oswaldo Cruz 95(2):193-198.
165. **Saridomichelakis MN, Mylonakis ME, Leontides LS, Koutinas AF, Billinis C, Kontos VI. 2005.** Evaluation of lymph node and bone marrow cytology in the diagnosis of canine leishmaniasis (*Leishmania infantum*) in symptomatic and asymptomatic dogs. Am J Trop Med Hyg 73(1):82-86.
166. **Schallig HD, Cardoso L, Hommers M, Kroon N, Belling G, Rodrigues M, Semiao-Santos S, Vetter H. 2004.** Development of a dipstick assay for detection of *Leishmania*-Specific canine antibodies. J Clin Microbiol 42(1):193-197.
167. **Seifert K, Croft SL. 2006.** In vitro and in vivo interactions between miltefosine and other antileishmanial drugs. Antimicrob. Agents Chemother 50(1):73-79.
168. **Silva F, Gomes R, Prates, Deboraci P, Miranda JC, Andrade B, Barral-Netto M, Barral A. 2005.** Inflammatory cell infiltration and high antibody production in balb/c mice caused by natural exposure to *Lutzomyia longipalpis* bites. Am J Trop Med Hyg 72(1):94-98.
169. **Shaw JJ. 2006.** Further thoughts on the use of the name *Leishmania (Leishmania) infantum chagasi* for the aetiological agent of American visceral leishmaniasis. Mem Inst Oswaldo Cruz 101(5):577-579.
170. **Sousa AQ, Pearson R. 2009.** Drought, Smallpox, and Emergence of *Leishmania braziliensis* in Northeastern Brazil. Emerging Infectious Diseases 15(6):916-921.
171. **Stuart K, Brun R, Croft S, Fairlamb A, Gürtler RE, McKerrow J, Reed S, Tarleton R. 2008.** Kinetoplastids: related protozoan pathogens, different diseases. J Clin Invest 118(4):1301-1310.
172. **Tejada A, Cáceres A, Miranda J, Palacios O, Zorrilla V. 2003.** Vectores de la leishmaniasis tegumentaria en el valle del Rímac. Anales de la Facultad de Medicina 64(4):218-222.
173. **Travi BL. 2000.** Leishmaniasis visceral canina. MVZ-Córdoba 5(1):29-32.
174. **Travi BL, Tabares C, Cadena H. 2006.** *Leishmania (Viannia) braziliensis* infection in two colombian dogs: a note on infectivity for sand flies and response to treatment. Rev Biomédica 26(Suppl.1):249-253.
175. **Tizard IR. 1998.** Inmunología Veterinaria. 5ª ed. México: McGraw-Hill. 567 p.

176. **Todolí FS, Rodríguez AC, Alberola JD, Solano-Gallego L. 2008.** El reto de una vacuna contra la leishmaniosis canina. *Rev Argos* 101(9):36-38p.
177. **Vásquez AT. 2006.** Registro de leishmaniasis cutánea en caninos presentes en zonas peri-urbana de Villavicencio, Meta y su importancia en la salud pública. *Rev Orinoquia* 10(2):79-89.
178. **Wardrop KJ, Reine N, Birkenheuer A, Hale A, Hohenhaus A, Crawford C, Lappin MR. 2005.** Canine and Feline Blood Donor Screening for Infectious. En: *ACVIM Consensus Statements*. Dallas: American College of Veterinary Internal Medicine.
179. **Watts PC, Hamilton G, Ward RD, Noyes HA, Souza NA, Kemp SJ, Feliciangeli MD, Brazil R, Maingon RD. 2005.** Male sex pheromones and the phylogeographic structure of the *Lutzomyia longipalpis* species complex (diptera: *Psychodidae*) from Brazil and Venezuela. *Am J Trop Med Hyg* 73(4):734-743.
180. **Zaragoza CB. 2001.** Estudio electroforético de la proteinuria en perros sanos y en perros con enfermedad renal. Tesis doctoral de Médico Veterinario. Cáceres: Univ. de Extremadura de España. 318 p.
181. **Zárate JR, Rodríguez LT, Ramírez RA, Salinas JM, Florez-Pérez F. 2007.** Descripción de un caso de leishmaniasis canina clínica en el norte de México. *Vet Méx* 38(2):231-240.
182. **Zelazny AM, Fedorko DP, Li L, Neva FA, Fischer SH. 2005.** Evaluation of 7SL RNA gene sequences for the identification of *Leishmania spp.* *Am J Trop Med Hyg* 72(4):415-420.
183. **Zegarra RC; Sánchez LS. 2005.** Leishmaniasis cutánea: Presentación en placa verrucosa. *Dermatol Perú* 15:62-65.
184. **Zorrilla V, Agüero M, Cáceres A, Tejada A, Ticlla J, Martínez R. 2005.** Factores de riesgo que determinan la transmisión de la leishmaniasis en el valle Llaucano, Chota-Cajamarca. *Anales Fac Med* 66(1):33-42p.